



**Les stilbénoides chez les Cypéracées : isolation,  
identification et étude de leurs activités biologiques :  
identification et dosage des stilbènes dans des vins  
Tunisiens**  
Kamel Arraki

► **To cite this version:**

Kamel Arraki. Les stilbénoides chez les Cypéracées : isolation, identification et étude de leurs activités biologiques : identification et dosage des stilbènes dans des vins Tunisiens. Alimentation et Nutrition. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0481 . tel-01139777

**HAL Id: tel-01139777**  
**<https://theses.hal.science/tel-01139777>**

Submitted on 7 Apr 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Université de Bordeaux**  
**Université de Carthage Faculté des Sciences de Bizerte**

Année 2014

Thèse n° 481

**THÈSE PRÉSENTÉE**  
  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
  
**DOCTEUR DE**  
  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**  
**ET DE L'UNIVERSITÉ DE CARTHAGE**

**Mention : Sciences, Technologie, santé**

**Option : Nutrition**

Par

**Kamel ARRAKI**

*Né le 1<sup>er</sup> Mai 1980 à Kairouan (Tunisie)*

soutenue publiquement le :

10 décembre 2014

**Les stilbénoides chez les Cypéracées : Isolation,  
identification et étude de leurs activités biologiques.  
Identification et dosage des stilbènes dans des vins  
Tunisiens.**

*Membres du Jury :*

<b>M. Chérif Ben Nasr</b> , Professeur, Université de Bizerte-Carthage	Président
<b>M. Aly Raies</b> , Professeur, Université de Tunis	Rapporteur
<b>Mme Laurence Voutquenne</b> , Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne	Rapporteur
<b>M. Joël Crèche</b> , Professeur, Université de Tours	Examineur
<b>M. Ahmed Mahjoub</b> , Maître de Conférences, Université de Bizerte-Carthage	Co-Directeur
<b>M. Alain Decendit</b> , Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Directeur

**Titre :** Les stilbénoides chez les Cypéracées : Isolation, identification et étude de leurs activités biologiques. Identification et dosage des stilbènes dans les vins tunisiens.

**Résumé :** Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire végétal, dont la distribution au sein du règne végétal est limitée aux espèces qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à synthétiser ces molécules. Leurs impacts et leurs activités biologiques tels que les effets neuroprotecteurs, anticancérigènes, antioxydants ont déjà concerné plusieurs sujets d'étude. C'est dans ce contexte que l'objectif de notre travail a pris naissance. Dans un premier temps, nous avons isolé et identifié ces molécules chez quelques espèces de la famille des Cypéracées. Cette étude phytochimique a été réalisée en utilisant un ensemble de stratégies analytiques et préparatives faisant appel à la CLHP analytique et préparative et la CPC (Chromatographie de Partage Centrifuge) pour l'obtention des molécules pures et à la LC-Masse et la RMN pour l'identification des composés isolés. Dans un second temps, nous avons étudié les activités biologiques *in vitro* de ces produits telles que les activités antioxydantes par trois méthodes (ORAC, DPPH et MCA) et l'effet de ces stilbènes sur la cytotoxicité neuronale induite par le peptide  $\beta$ -amyloïde avec des cellules PC12. Nous avons isolé une nouvelle molécule, le carexinol A, pour la première fois, qui a montré une forte activité anti-amyloïde. La dernière partie de cette thèse fait état de l'analyse et du dosage des stilbènes dans des vins tunisiens dont le vin Sidi Zahia qui a donné les meilleurs résultats.

**Mots clés :** stilbènes, Cypéracées, CLHP, CPC, LC-Masse, RMN, ORAC, DPPH, carexinol,  $\beta$ -amyloïde, vin tunisien.

---

**GESVAB : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques –**

**EA 3675, UFR de Pharmacie, Université de Bordeaux**

**Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008, 33882 Villenave-d'Ornon**

**Title:** stilbenoids in Cyperaceae: Isolation, identification and study of their biological activities. Identification and assay of stilbene in Tunisian wines.

**Abstract:** Stilbenes are phenolic compounds of plant secondary metabolism, whose distribution within the plant kingdom is limited to species that have acquired during the evolution the ability to synthesize these molecules. Their impacts and their biological activities such as neuroprotective, anticarcinogenic, antioxidant effects have already touched several topics. It is in this context that the purpose of our work arose. First, we have isolated and identified these molecules in some species of the sedge family. Phytochemical studies were performed using a set of analytical and preparative strategies by means of analytical and preparative HPLC and CPC (Centrifugal Partition Chromatography) for obtaining pure molecules and LC-Mass and NMR for identification of compound isolated. In a second step, we investigated the in vitro biological properties of these products such as antioxidant activities by three methods (ORAC, DPPH and MCA) and their effect on neuronal cytotoxicity induced by  $\beta$ -amyloid peptide with PC12 cells. We isolated a new molecule, for the first time, carexinol A, that showed strong anti-amyloid activity. The last part of this thesis refers to the analysis and determination of stilbenes in Tunisian wines including Sidi Zahia wine that gave the best results.

**Keywords:** stilbenes, Cyperaceae, HPLC, CPC, LC-Mass, NMR, ORAC, DPPH, carexinol,  $\beta$ -amyloid, Tunisian wine.

---

**GESVAB : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques –**

**EA 3675, UFR de Pharmacie, Université de Bordeaux**

**Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008, 33882 Villenave-d'Ornon**



## *Remerciements*

A Madame et Messieurs les membres du jury,

*Monsieur le Professeur Chérif Ben Nasr*, du Laboratoire de Chimie des Matériaux à la Faculté des Sciences de Bizerte de l'Université de Bizerte-Carthage, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma Thèse d'Université et d'en être le Président.

*Monsieur le Professeur Aly Raies*, Professeur à la Faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis de l'Université de Tunis El-Manar, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma Thèse d'Université et d'en être le rapporteur.

*Madame le Professeur Laurence Voutquenne*, du Laboratoire de Botanique et Mycologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma Thèse d'Université et d'en être le rapporteur.

*Monsieur le Professeur Joël Crèche*, du Laboratoire de Biologie Cellulaire et Biochimie végétale de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Tours, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma Thèse d'Université.

*Monsieur le Docteur Ahmed Mahjoub*, du Laboratoire des Composés Thioorganiques de la Faculté des Sciences de Bizerte de l'Université de Bizerte-Carthage, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de faire partie du jury de ma Thèse d'Université et d'en avoir été le co-directeur. Je vous remercie aussi pour m'avoir aiguillé vers la phytochimie et vers cette Thèse au GESVAB

*Monsieur le Docteur Alain Decendit*, du Laboratoire GESVAB de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Bordeaux, je tiens à vous remercier pour avoir accepté de me diriger pendant toute cette Thèse et à votre formation à la phytochimie. Merci de m'avoir encadré, merci pour ta sympathie et ton accessibilité de tous les jours.

Je suis reconnaissant envers *le Docteur Alain Badoc*, botaniste éclairé, pour le temps qu'il m'a dispensé tout au long de la durée de cette thèse.

A tous les membres de l'équipe de recherche GESVAB EA3675,

*Monsieur le Professeur Jean-Michel Mérillon*, merci beaucoup encore de m'avoir accepté au sein de votre équipe de recherche dont vus êtes le Directeur pour réaliser mes travaux de recherche pendant ces années de Thèse.

Aux *Docteurs Tristan Richard, Pierre Waffo, Stéphanie Krisa, Stéphanie Cluzet, Alain Badoc, Jean-Claude Delaunay* un immense merci pour toute l'aide que vous m'avez apportées dans vos domaines respectifs, principalement en phytochimie, en analyse structurale par spectrométrie de Masse et RMN, lors des études biologiques *in vitro* et en botanique.

Mes remerciements s'adressent à l'ensemble du personnel de GESVAB. Un très grand merci à toute l'équipe. Aux *Ingénieurs et Techniciens du laboratoire, Marie Micouleau-Télef, Elodie Renouf, Eric Pédrot, Antonio Palos-Pinto, Marie-Laure Iglesias, Meriam Nassra, Céline rivièrè, Laurent Bechamat et Gérard Fondeville* pour tous les coups de main que vous m'avez si souvent donnés dans différents domaines, HPLC, Masse, RMN, "manips" bio, informatique...

Je tiens à remercier tout particulièrement encore *Jonathon Bisson, Tristan Richard et Pierre Waffo-Téguo* (pour la RMN et CL-MS), qui m'ont consacré du temps pour la détermination de la nature des composés, pour l'acquisition et l'interprétation des spectres de RMN.

Un grand merci à *Stéphanie Krisa*, pour avoir passée beaucoup de temps à m'expliquer les manips bio et pour m'avoir aidé pour l'analyse des résultats.

Sans oublier aussi tous les étudiants de DEUST, SIR, Master2 Recherche en stage au laboratoire qui ont pu travailler avec moi au cours de ces années et qui m'ont beaucoup aidé dans mes expériences.

Un merci tout particulier à deux personnes qui me sont chères. Merci à ma chérie Abir, merci à ma sœur Chérifa, merci pour vos conseils et vos encouragements.

Je remercie mes parents pour la patience dont ils ont fait preuve au cours de ces quatre années. Merci de m'avoir soutenu, encouragé et pour m'avoir permis de réaliser ces longues études.

Je suis enfin reconnaissant envers ceux qui ont contribué, peu ou prou, à ce travail et que j'ai oubliés involontairement lors de la rédaction de ces remerciements. Je conclus ici en remerciant une nouvelle fois l'ensemble du personnel de GESVAB, en vous souhaitant une très bonne continuation pour les années à venir.

Ce travail a été réalisé avec le soutien financier du Ministère de la Recherche Scientifique de la Tunisie. Je tiens principalement à remercier le Gouvernement Tunisien pour la Bourse de Coopération.

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Matériels et méthodes .....</b>	<b>38</b>
<b>Résultats et Discussion .....</b>	<b>67</b>
<b>Conclusions générales .....</b>	<b>122</b>
<b>Perspectives.....</b>	<b>140</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>142</b>

## Liste des Abréviations

**ACN** : Acétonitrile

**AcOH** : Acide acétique

**AF** : Acide formique

**ANR** : Anthocyanidine réductase

**APP** : Precursor protein

**ANS** : Anthocyanidine synthase

**AAPH** : 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride

**CCM** : Chromatographie sur couche mince

**CLHP** : Chromatographie Liquide à Haute Performance

**CL-SM** : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à un spectromètre de Masse

**CL-RMN** : Chromatographie Liquide couplé à la Résonance Magnétique Nucléaire

**CPC** : Chromatographie de Partage Centrifuge

**COSY** : COrelated SpectroscopY

**CHS** : Chalcone synthase

**CML** : Cellules musculaires lisses

**C4H** : Cinnamate-4-hydroxylase

**CHI** : Chalcone isomérase

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**4CL** : 4-coumarate coenzyme A ligase

**DFR** : Dihydroflavonol réductase

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax

**DCFH<sub>2</sub>-DA** : 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester

**DCF** : 2'7'-dichlorofluorescein

**EC<sub>50</sub>** : Effective Concentration 50 %- Concentration nécessaire pour obtenir 50 % de l'activité maximale

**EDHF** : Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

**ESY** : ElectroSpray Ionisation

**FeSO<sub>4</sub>** : Sulfate ferreux

**GESVAB** : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques

**GT** : Glycosyltransférases

**HMBC** : Heteronuclear Multi-Bond Correlation

**HSQC** : Heteronuclear Single-Quantum Correlation

**HDL** : Lipoprotéines de haute densité

**INSERM** : Institut national de la santé et de la recherche médicale

**K<sub>c</sub>** ou **K<sub>d</sub>**: Coefficient de distribution ou coefficient de partage

**LDL** : Lipoprotéines de base densité

**LAR** : Leucoanthocyanidine réductase

**LDOX** : Leucoanthocyanidine dioxygénase

**mAU** : Milli unité d'absorbance (milli-Absorbance Unit)

**MeOH** : Méthanol

**MF** : Matière fraîche

**MS** : Matière sèche

**MCA** : Metal Chelating Activity

**MTT** : 3-(4,5-diméthylethiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide

**NOESY** : Nuclear Overhauser effect spectroscopy

**NO** : Monoxyde d'azote

**N<sub>2</sub>** : Diazote

**OCDE** : Organisation de coopération et de développement économiques

**OMT** : O-méthyltransférase

**ORAC** :Oxygen radical absorbance capacity

**PAL** : Phenylalanine Ammonia Lyase

**Ppm** : Parties par million

**PMT** : Pinosylvine O-méthyltransférases

**PTFE** : Filtre à membrane en polytétrafluoroéthylène

**PBS** :Phosphate buffered saline

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**Rpm** : Révolutions par minute

**ROESY** : Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy

**ROMT** : Resveratrol O-methyltransferase

**ROS** : Reactive oxygen species, espèces réactives oxygénées

**SM** : Spectrométrie de Masse

**STS** : Stilbène synthase

**SPE** : Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)

**SAM** : S-adénosyl méthionine

**TFA** : Acide trifluoroacétique

**t<sub>r</sub>** : Temps de rétention

**UHPLC** : Chromatographie liquide à ultra-haute performance

**UV** : Ultraviolet

**UDP** : Uridine diphosphate

**V<sub>m</sub>** : Volume mort

**V<sub>r</sub>** : Volume de rétention

## Avant-propos

Les plantes sont capables de produire des métabolites secondaires tels que les composés phénoliques. Par leur diversité structurale, ces derniers sont appelés polyphénols qui sont largement exploités par les industries agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Les polyphénols sont présents dans toutes les parties de la plante. Des études épidémiologiques suggèrent que ces métabolites secondaires ont un rôle important contre le développement de diverses pathologies dégénératives associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers.

Actuellement, grâce au développement des méthodes d'extraction et des techniques d'analyses physico-chimiques et biologiques, une meilleure connaissance de la composition des plantes est devenue possible. La recherche d'extraits végétaux riches en molécules à fortes activités pharmacologiques reste des domaines de recherche importants.

C'est dans ce contexte que l'étude allant de l'extraction jusqu'à l'identification des composés tel que les stilbènes que notre travail a pris naissance.

Mon sujet de Thèse a été réalisé à Bordeaux sous la direction d'Alain Decendit et concerne les stilbénoides chez les Cypéracées et leurs activités biologiques.

Cette thématique stilbénoides chez les Cypéracées s'articule autour de plusieurs points :

- extraction, purification et identification de nouveaux stilbènes dans des racines de différents genres de Cypéracées ;
- recherche de nouvelles molécules dans les racines et autres parties végétales telle que les feuilles, tiges et graines ;
- dosage des molécules identifiées dans ces différentes parties ;
- étude des propriétés biologiques, thérapeutiques et pharmacologiques des divers stilbènes identifiés ;
- essai de production en grandes quantités des stilbènes qui présentent des activités biologiques marquées par culture cellulaire ;
- recherche des stilbénoides identifiés chez les Cypéracées dans le vin et la Vigne et leur dosage dans le vin et particulièrement dans des vins tunisiens.

Le GESVAB est une Equipe d'Accueil de l'Université de Bordeaux, intégrée à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin de Bordeaux et à l'IFR 103. Ce groupe d'étude est constitué de deux laboratoires de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux, le

Laboratoire de Sciences Végétales, Mycologie et Biotechnologie (Professeur J.M. Mérillon) et le Laboratoire de Physique et Biophysique (Professeur J.P. Monti).

Le GESVAB est dirigé par le Professeur Jean-Michel Mérillon. La thématique de recherche porte sur l'étude du lien entre les polyphénols et la santé. Il est composé d'une équipe de recherche et d'une cellule de transfert technologique, Polyphénols Biotech, qui est rattaché pour la valorisation industrielle.

Deux axes principaux sont développés sur cette thématique :

- 1- Phytochimie : extraction, purification, identification et analyse de stilbènes complexes de la Vigne et du vin et d'autres plantes riches en stilbènes (telles que les Cypéracées) : par CPC, LC-MS, LC-RMN ;
- 2- Neuroprotection des polyphénols de la Vigne et du vin (activités anti-amyloïdogénique et cytoprotectrices).

La première partie de ce mémoire de thèse est consacrée à une présentation générale sur les stilbénoides, les différentes techniques de biosynthèse et les activités biologiques et pharmacologiques de ces composés.

La deuxième partie présente les genres et les espèces de Cypéracées déjà étudiés chimiquement ainsi que les différentes parties analysées renfermant des stilbénoides.

La troisième partie concerne les études analytiques et préparatives de l'extraction, en passant par différentes techniques de chromatographie : CCM, CLHP-DAD, CPC jusqu'à l'identification par LC-MS et RMN.

La dernière partie traite des activités biologiques et pharmacologiques des différents stilbénoides isolés et purifiés.



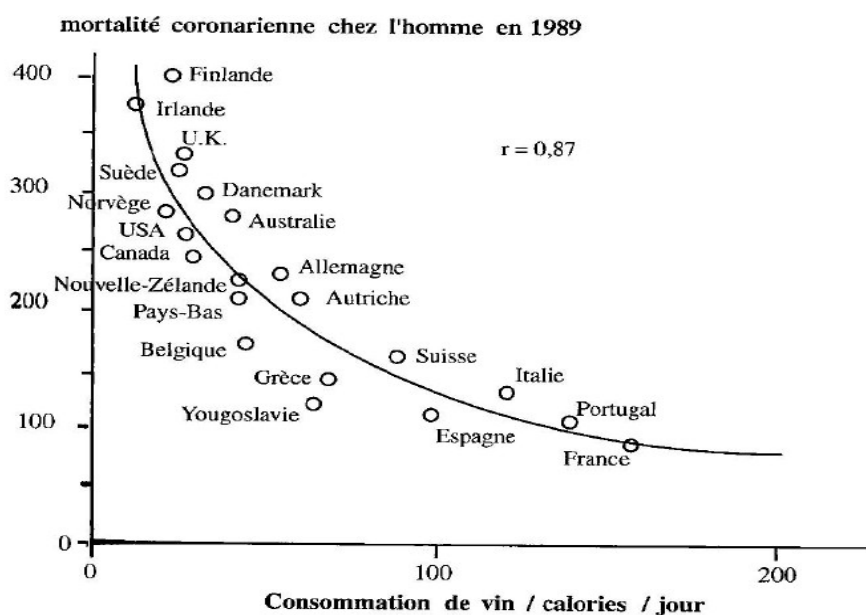
# Introduction

## Polyphénols du vin et santé

*L'intérêt que porte le GESVAB laboratoire d'accueil pour les polyphénols provient d'une "longue tradition" à Bordeaux et a été suscité en partie par des études épidémiologiques réalisées autour de la consommation modérée de vin et ses prétendus effets bénéfiques sur la santé.*

Au début des années 1990, des études d'épidémiologie sur les maladies cardiovasculaires ont donné naissance au concept du « French paradox ». Les statisticiens et les cardiologues ont constaté que les Français, qui ont une ration calorique riche en graisses saturées, ce qui devrait entraîner du diabète, de l'hypertension mais aussi de l'hypercholestérolémie, ont paradoxalement un taux de mortalité coronarienne bien plus bas que celui d'autres peuples des pays industrialisés (Renaud et De Lorgeril, 1992) (**Figure 1**).

Au même moment, de nombreuses données épidémiologiques mettent en évidence qu'une consommation régulière et modérée de vin rouge permettrait de diminuer l'incidence de pathologie majeures comme le cancer et les maladies cardiovasculaires, notamment en France (Renaud et de Lorgeril, 1992 ; Renaud et Guéguen, 1998) (**Figure 1**) mais aussi dans d'autres pays, comme par exemple le Danemark (Gronbaek *et al.*, 1995 et 2000).

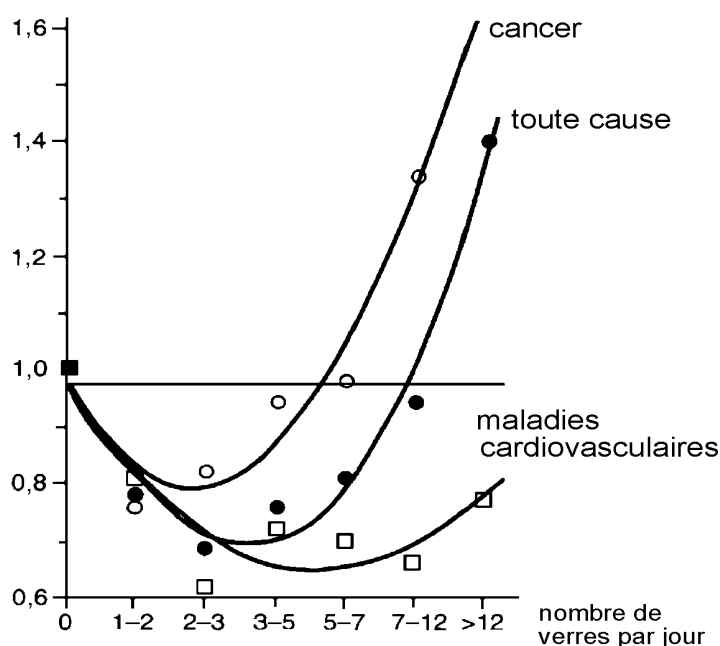


**Figure 1** : Relation entre le taux de mortalité par maladie coronarienne et la consommation de vin pour différents pays (OCDE, 1991). Une relation inverse est observée, la régression étant exponentielle ( $P < 0,05$ ) (Renaud *et al.*, 1998).

De plus, des études mettent en évidence que le resvératrol, molécule présente au niveau de la pellicule des baies de raisin (Creasy et Coffee, 1998), et dans les vins rouges (Sieman et Creasy, 1992) est capable d'inhiber l'oxydation des « low density lipoproteins » (LDL) impliquées dans le transport du cholestérol sanguin (Frankel *et al.*, 1993). Certains auteurs émettent alors l'hypothèse que le resvératrol pourrait être une des molécules impliquées dans le phénomène du « French paradox » (Kopp, 1998).

Renaud et Gueguen, en 1998, ont montré qu'une consommation modérée de vin de l'ordre de 1 à 3 verres par jour soit 150 à 300 ml/jour conduirait à une réduction de cette mortalité de l'ordre de 30 à 50 % par rapport aux non-consommateurs. Cependant, une consommation plus importante (plus de 4 à 5 verres par jour) est dommageable (**Figure 2**). Ainsi, un bénéfice en matière de santé ne peut être observé que pour une consommation très modérée et régulière de vin uniquement.

Ces effets bénéfiques seraient dus au fait que le vin, et particulièrement le vin rouge, est une boisson complexe riche en substances naturelles appelées polyphénols. La présence de ces polyphénols en quantité importante dans le vin dépend de la technique de vinification qui permet une forte extraction de ces molécules (pressurage après fermentation et étape de macération, conservation des pépins et de la pellicule au niveau du jus et de la pulpe) et pourrait expliquer les effets positifs mis en évidence par les études épidémiologiques. Parmi ces composés, on trouve notamment les flavonoïdes qui interviennent pour une grande part dans les propriétés gustatives, les anthocyanes qui donnent la couleur rouge et les stilbènes comme le resvératrol.



**Figure 2 :** Risque relatif de mortalité par cancer, par toute cause et par les maladies cardiovasculaires en rapport avec la consommation d'alcool, 82 % étant du vin. (un verre = 1 g d'alcool). La valeur 1.0 correspond à des non-buveurs. (Renaud et Gueguen, 1998).

Les vins rouges ont pour principale particularité par rapport aux autres boissons alcoolisées de contenir des polyphénols. Les anthocyanes et les proanthocyanidols se rencontrent à forte concentration dans les vins rouges alors qu'ils ne sont présents qu'en très faibles quantités dans les vins blancs ou rosés (Waterhouse et Teissèdre, 1997). D'autres polyphénols n'ont été isolés de façon indiscutable que très récemment et sont moins représentés comme les stilbènes, des isomères du resvératrol et leurs glucosides que le GESVAB a mis en évidence.

## 1. Les polyphénols

Pour s'adapter à leur environnement au cours de l'évolution, les plantes ont eu tendance à émerger du monde aquatique au monde terrestre par des mécanismes de défense contre les rayonnements UV, les agents pathogènes, les herbivores ou encore les stress abiotiques. La création de nouvelles molécules est un exemple d'adaptation permis par la formidable capacité de biosynthèse des chloroplastes. Parmi ces molécules, certaines appartiennent au métabolisme secondaire. Ce dernier est une particularité des végétaux

supérieurs qui les distingue des animaux. Les composés secondaires sont synthétisés à partir de quelques voies métaboliques primaires, dont la voie des phénylpropanoïdes, des terpénoïdes et des alcaloïdes. La richesse et la composition en métabolites secondaires chez les espèces végétales dépendent en général des conditions environnementales.

Les polyphénols sont des molécules naturelles issues du métabolisme secondaire des végétaux. Ils sont largement répandus dans l'alimentation et leurs principales sources sont les fruits et légumes, les céréales et les légumes secs mais également certaines boissons (vin, thé, café, jus de fruits). En France, la consommation moyenne de polyphénols apportés par l'alimentation est estimée à 1g/jour/personne (Brat *et al.*, 2006).

Le terme polyphénol a été introduit en 1980. Il remplace l'ancien terme "tanin végétal". Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils ont en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyle (Sarni-Manchado *et al.*, 2006 ). Ils sont associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques (acide gallique), à des composés hautement polymérisés, de plus de 30 000 daltons, comme les tanins (acide tannique) (Bamforth, 1999).

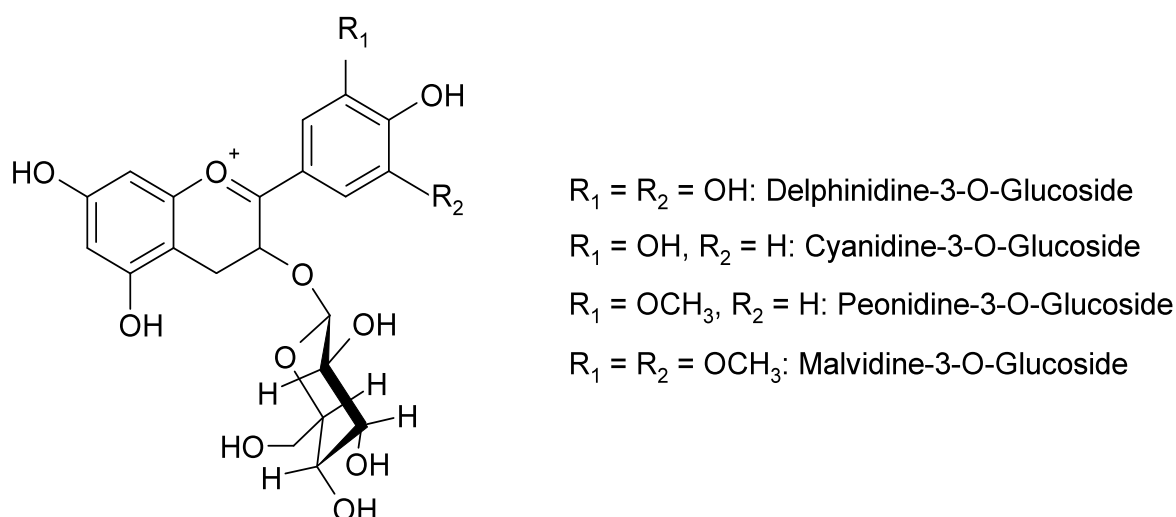
Les polyphénols sont communément divisés en 2 principales classes, les flavonoïdes et les non-flavonoïdes, constituées elle-même de différentes sous-classes.

### **1.1. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des molécules présentes dans les plantes et responsables des couleurs jaune, rouge, bleue, brune des fleurs et fruits. Tous les organes du système végétal en contiennent, des racines jusqu'aux fruits. Tous ces composés ont une structure en C6-C3-C6 qui forme l'unité flavone avec deux cycles benzéniques reliés par un hétérocycle oxygéné. Parmi les flavonoïdes, on différencie notamment les anthocyanes, les flavanols, les flavonols, les chalcones et les tanins condensés.

### 1.1.1. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui sont solubles dans l'eau. Ils donnent les couleurs rose, rouge, bleu et violet qu'on peut retrouver dans les feuilles, les pétales et les fruits. Ils s'accumulent dans les vacuoles des cellules de l'épiderme des feuilles (Guidoni *et al.*, 1997 ; Ezzili *et al.*, 1999 ), et au niveau de la pellicule des baies de raisin (Koeppen et Basson, 1966). Ces composés existent sous forme d'hétérosides formés par la condensation d'une molécule non glucidique (appelé aglycone), d'oses et souvent, de groupes acyles (**Figure 3**). Les anthocyanes se rencontrent en grande quantité dans un certain nombre de fruits tels que la myrtille, la cerise, le raisin. Ils peuvent participer à la couleur des feuilles en automne. Ils jouent un rôle important dans la pollinisation des fleurs et la dispersion des graines et des fruits (en attirant les insectes et les animaux). Ils ont aussi un rôle protecteur contre les UV et le stress oxydant.



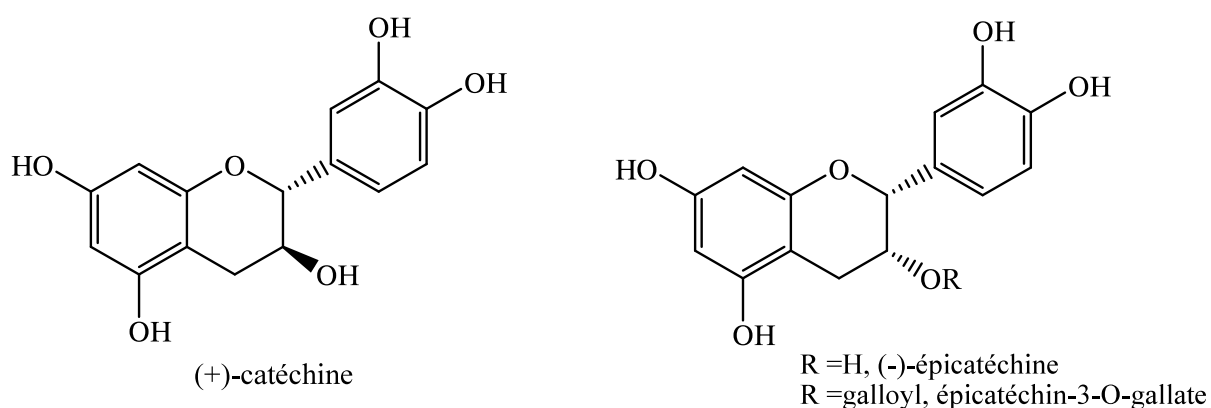
**Figure 3** : Exemple de structure d'anthocyanes présents dans le genre *Vitis*.

### 1.1.2. Les flavanols et les tanins

Les flavanols ou flavan-3-ols sont une sous classe des flavonoïdes dont la structure est basée sur la 2-phényl-3-chromanol. Ils sont caractérisés par leur hétérocycle central C ne

comportant qu'une seule substitution en 3 par un hydroxyle OH. Les flavanols les plus abondants sont les catéchine et les épicatechines (**Figure 4**).

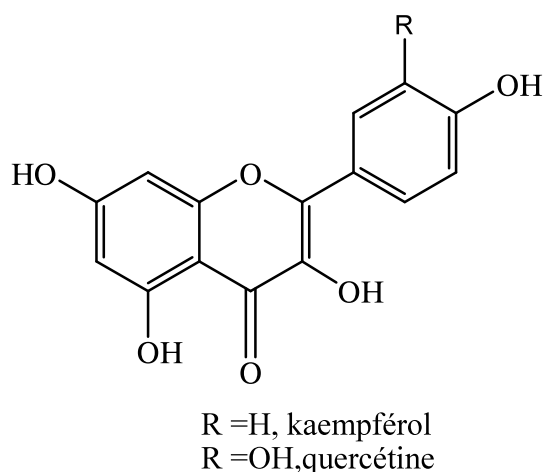
Les tanins condensés sont des polymères de flavanols. Ils sont constitués de flavan-3-ols liés entre eux par des liaisons carbone-carbone de type 4-8 ou 4-6. Ces tanins sont très abondants chez certains fruits consommés par l'homme comme les prunes, les fraises et les pommes ou des boissons comme le vin. Les tanins sont en concentration importante dans les pépins et la pellicule des baies de raisin où ils peuvent s'accumuler dans les vacuoles ou les parois (Gagné, 2007 ; Lacampagne, 2010).



**Figure 4 :** Exemple de structure de trois flavan-3-ols

### 1.1.3. Les flavonols

Les flavonols sont un sous groupe de flavonoïdes dérivés de la 3-hydroxyflavone ou flavonol (**Figure 5**). Ils peuvent être liés à un sucre, le plus souvent le glucose. Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair. Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxyles phénoliques, parfois de méthyles. Comme les anthocyanes, ils jouent un rôle dans la protection contre les UV, ils sont stockés dans la vacuole mais peuvent être présents dans le noyau et la membrane plasmique (Peer *et al.*, 2001).



**Figure 5** : Exemple de structure de deux flavonols

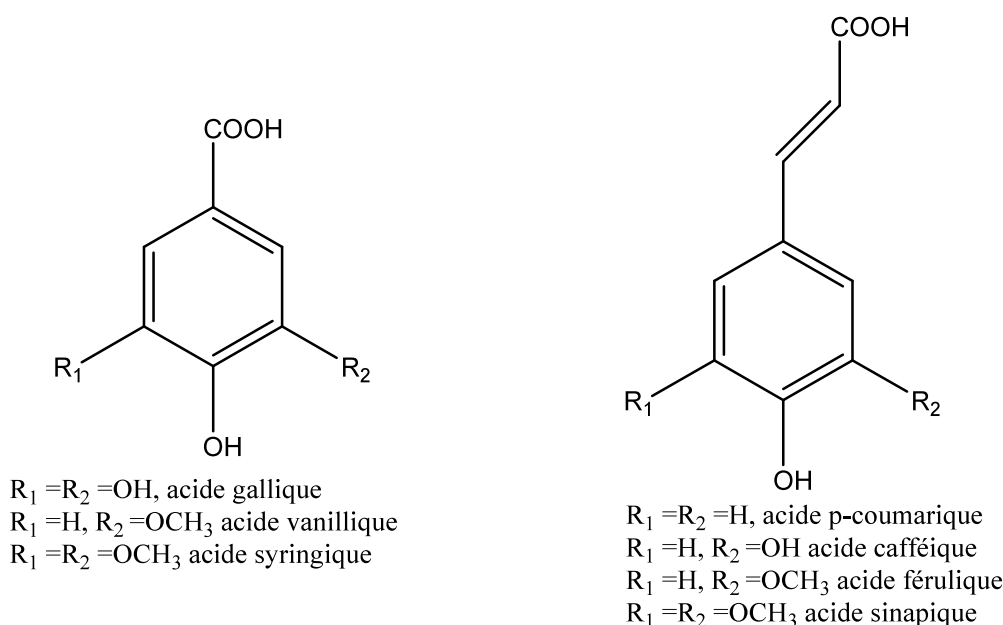
## 1.2. Les non-flavonoïdes

### 1.2.1. Les acides phénols

Un acide phénol ou acide phénolique est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie consiste à réserver ce terme aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique.

Les acides phénols regroupent donc les acides benzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Les acides benzoïques sont formés à partir de l'acide cinnamique et possèdent une structure en C6-C1 (**Figure 6**). Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide *p*-coumarique, lui même formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate-4-hydroxylase. Ils peuvent se trouver sous forme d'esters tartriques (Ribéreau-Gayon, 1965), d'aldéhydes (Luque-Rodriguez *et al.*, 2006) ou d'hétérosides.



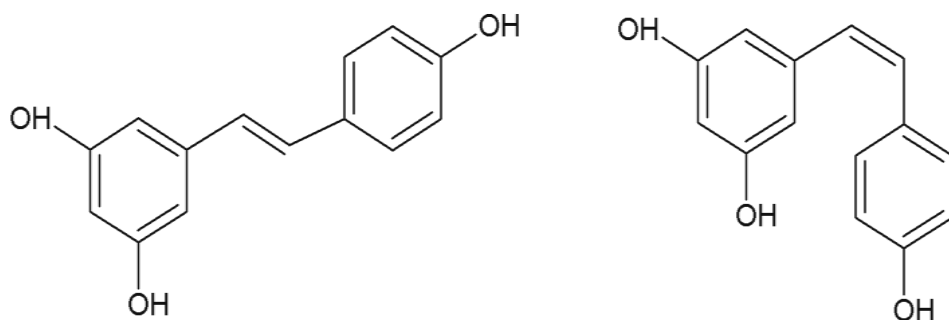


**Figure 6 :** Exemple de structure de sept acides phénols

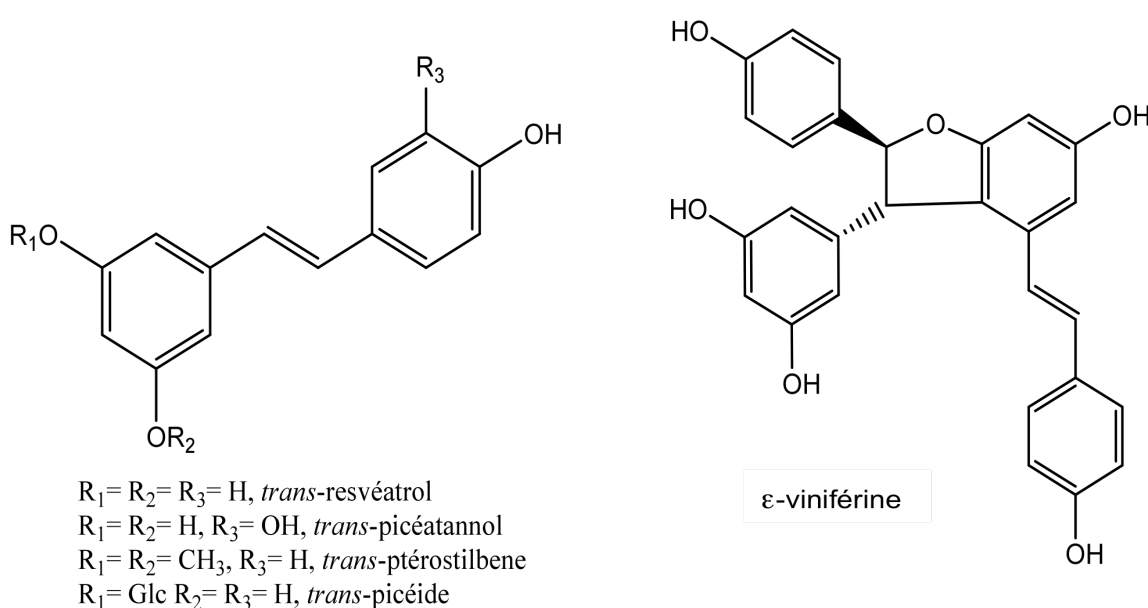
### 1.2.2. Les stilbènes

Les stilbènes ont une structure en C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène. Il existe deux formes isomériques : (*E*)-1,2-diphényléthylène ((*E*)-stilbène) et (*Z*)-1,2-diphényléthylène ((*Z*)-stilbène) (**Figure 7**). La forme *cis* (*Z*) est obtenue par photoisomérisation ou par l'action de la chaleur. La forme *trans* (*E*) étant la forme la plus stable et bioactive (Mérillon *et al.*, 1997), elle est en général plus abondante dans les différentes espèces végétales productrices de stilbènes (Hart, 1981).

Les stilbènes forment la famille des stilbénoides. Ils sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures. L'unité de base des stilbènes est le (*E*)-3,5,4'-hydroxystilbène ou (*E*)-resvératrol (**Figure 7**). Les dérivés du resvératrol varient en fonction du nombre de groupements hydroxyle, des substitutions par les sucres, les groupements méthoxy, par la conformation (*Z*) ou (*E*) et par le degré d'oligomérisation, etc. (**Figure 8**).



**Figure 7 :** Structures chimiques des (*E*)- et (*Z*)-resvératrols.



**Figure 8 :** Exemple de structure de cinq stilbènes

Le GESVAB s'est spécialisé dans les polyphénols de la Vigne et leurs activités biologiques, et plus particulièrement les stilbènes et leurs activités neuroprotectrices. Pour faire face à la complexité et à la diversité des molécules de cette famille, il dispose d'outils allant de l'extraction des substances actives à leur purification, leur identification et leur étude biologique.

## 2. Description générale des stilbènes

Le mot stilbène dérive du grec stilbos, signifiant « briller », un nom donné suite à l'observation d'une forte fluorescence bleue sous l'action de rayonnements ultraviolets (UV). Cette propriété physico-chimique fait des stilbènes des molécules facilement caractérisable en chromatographie en couche mince (CCM), en chromatographie en phase liquide (CLHP) par

utilisation d'un détecteur UV ou d'un détecteur à barrettes de diodes, ou même directement par fluorescence en lumière UV (Poutaraud *et al.*, 2007).

Les stilbènes présentent une forte absorbance à des longueurs d'onde comprises entre 220 et 307 nm. A l'exception des formes glycosylées, les stilbènes sont faiblement solubles dans l'eau, mais sont généralement solubles dans des solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol, l'acétate d'éthyle, l'acétone ou l'acide acétique (Hart, 1981)

Les stilbènes sont un groupe de polyphénols non flavonoïdiques issus du métabolisme secondaire végétal et qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes . Ils sont rencontrés sous forme de monomères et d'oligomères en grande quantité dans un nombre limité de familles botaniques : Pinaceae, Gnetaceae, Cyperaceae, Vitaceae, Dipterocarpaceae, Moraceae, Polygonaceae... (Rivière *et al.*, 2012).

Ainsi, au sein de GESVAB, le Dr Alain Badoc, après une importante étude bibliographique et d'expériences préliminaires, a retenu 12 familles botaniques parmi lesquelles certaines espèces sont capables de synthétiser des stilbènes en quantités importantes : Pinacées, Gnétacées, Welwitschiacées, Mélanthiacées, Cypéracées, Vitacées, Diptérocarpacées, Moracées, Fagacées, Fabacées, Myrtacées et Polygonacées. Du fait de la disponibilité d'un panel de Cypéracées au Jardin Botanique de Talence (JBT) et de l'abondance de ces plantes en Aquitaine, nous avons choisi d'étudier les stilbènes de cette famille.

Ces métabolites secondaires suscitent beaucoup d'intérêt pour leurs propriétés biologiques, comme les activités chimopréventives et neuroprotectrices. Le resvératrol, représentant le plus célèbre des stilbènes, a été découvert en 1939 au Japon chez *Veratrum grandiflorum* de la famille des Melanthiacées (Takaoka, 1939).

## 2.1. La voie de biosynthèse des stilbènes

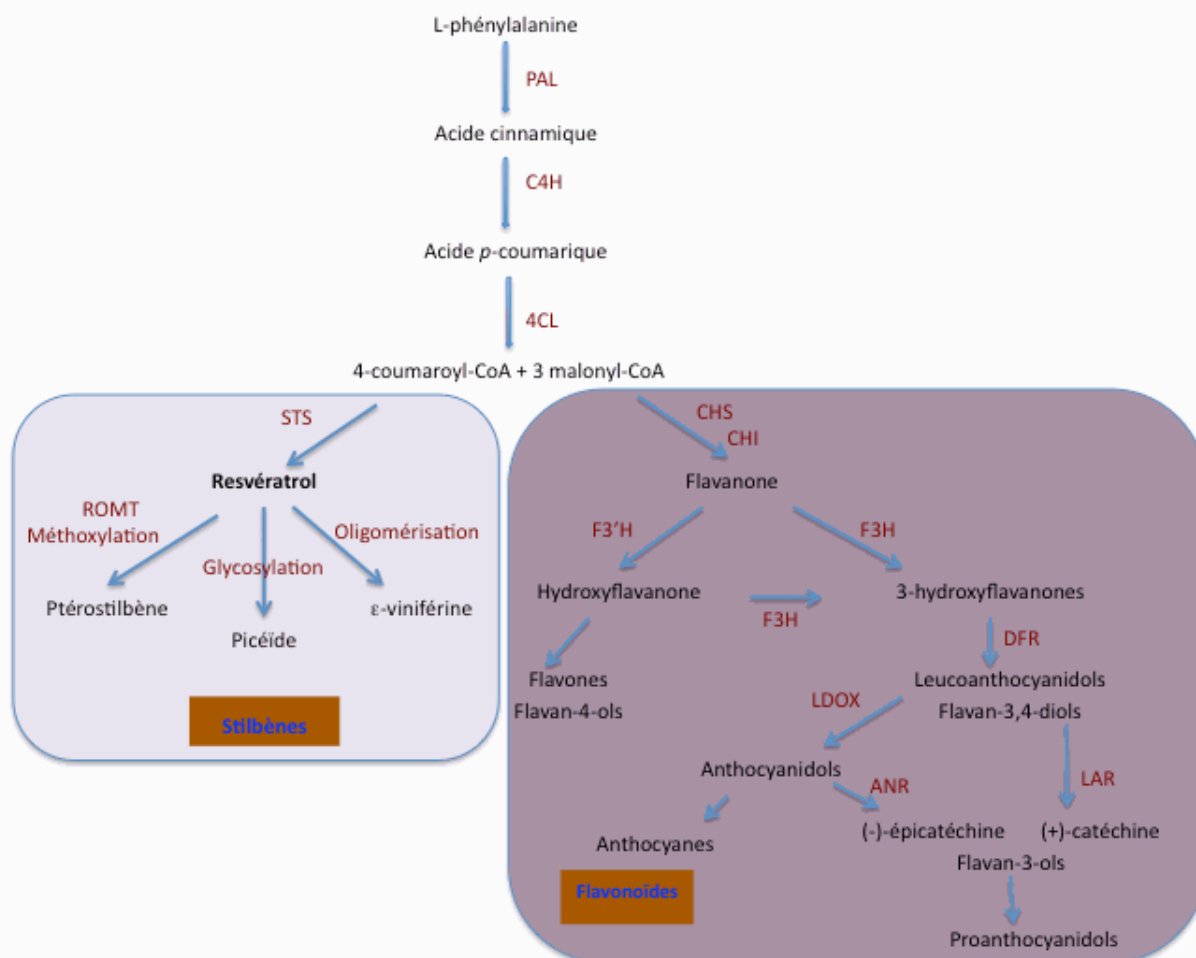
### 2.1.1. Les monomères

Les stilbènes végétaux sont issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, une voie métabolique relativement simple (Donnez *et al.*, 2009). Les phénylpropanoïdes, sont des composés organiques possédant un squelette carboné de type C6-C3.

La première enzyme de cette voie de biosynthèse est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui catalyse l'acide aminé phénylalanine pour donner l'acide cinnamique, par un processus de désamination (**Figure 9**). Cette étape, commune à tous les végétaux supérieurs, constitue une étape charnière qui permet de diriger le flux de carbone du métabolisme primaire (voie de biosynthèse du shikimate) vers le métabolisme secondaire (voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes) (Dixon et Paiva, 1995 ; Hahlbrock et Scheel, 1989 ; Vogt, 2010).

A partir de l'acide cinnamique se forme l'acide coumarique. Ce dernier est issu de l'hydroxylation du groupement phényle de l'acide cinnamique par un cytochrome P450 hydroxylase (C4H, cinnamate 4-hydroxylase).

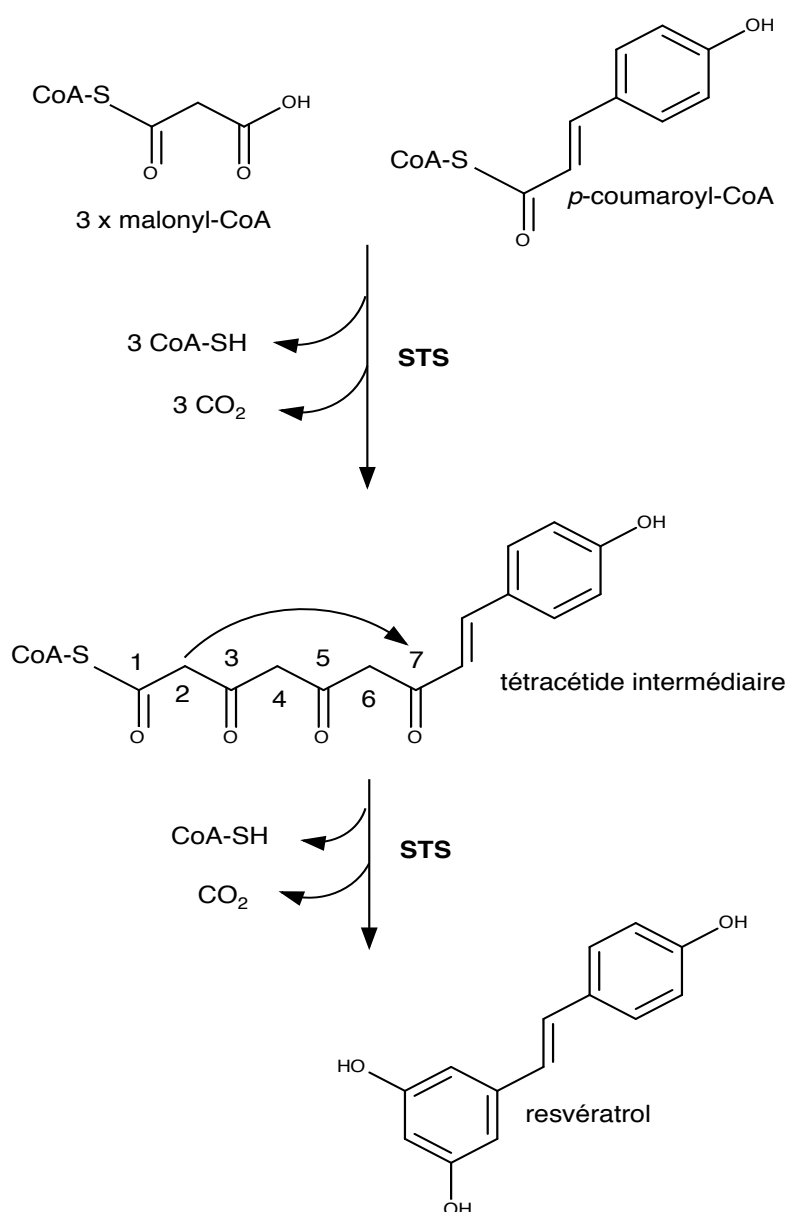
L'estérification de l'acide coumarique par l'enzyme 4-coumarate : CoA ligase (4CL) est à l'origine du *p*-coumaroyl-CoA, précurseur des flavonoïdes, des isoflavonoïdes, des anthocyanes et des stilbènes (**Figure 9**). Le *p*-coumaroyl-CoA peut être synthétisé directement à partir de l'acide aminé tyrosine, réduisant ainsi le nombre d'étapes nécessaires à l'obtention de ce métabolite (Ferrer *et al.*, 2008).



**Figure 9 :** Voie de biosynthèse des composés phénoliques (Dixon et Paiva, 1995). ANR : anthocyanidine réductase ; ANS : anthocyanidine synthase ; C4H : cinnamate-4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate coenzyme A ligase ; CHS : chalcone synthase ; CHI : chalcone isomérase ; DFR : dihydroflavonol réductase ; F3'H : NASPH-cytochrome P450-flavonoïde 3'5'-hydroxylase ; F3H : flavanone 3-B-hydroxylase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; PAL : phénylalanine ammonialyase ; ROMT : resvératrol *O*-méthyl transférase ; STS : stilbène synthase.

Les stilbènes dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, et leur synthèse est initiée par une enzyme caractéristique des plantes productrices de stilbènes : la stilbène synthase (STS) (Chong *et al.*, 2009). Cette enzyme a été identifiée puis purifiée pour la première fois en 1984 à partir de suspensions cellulaire d'Arachide (Schöppner et Kindl, 1984). La stilbène synthase permet la synthèse de resvératrol ou de pinosylvine à partir de 3 molécules de malonyl-CoA et

d'un dérivé ester-CoA d'acide hydroxycinnamique : le *p*-coumaroyl-CoA dans le cas du resvératrol, et le *p*-cinnamoyl-CoA dans le cas de la pinosylvine (Jeandet *et al.*, 2002). La réaction est complexe et implique la condensation de 3 unités de malonyl-CoA au niveau de l'ester-CoA d'acide hydroxycinnamique, la formation d'un polycétide intermédiaire qui sera par la suite cyclisé par une condensation du carbone 2 sur le carbone 7, accompagnée d'une étape de décarboxylation (Tropf *et al.*, 1994). Cette condensation est dite de type Aldol (**Figure 10**).



**Figure 10.** Biosynthèse du resvératrol par la stilbène synthase.

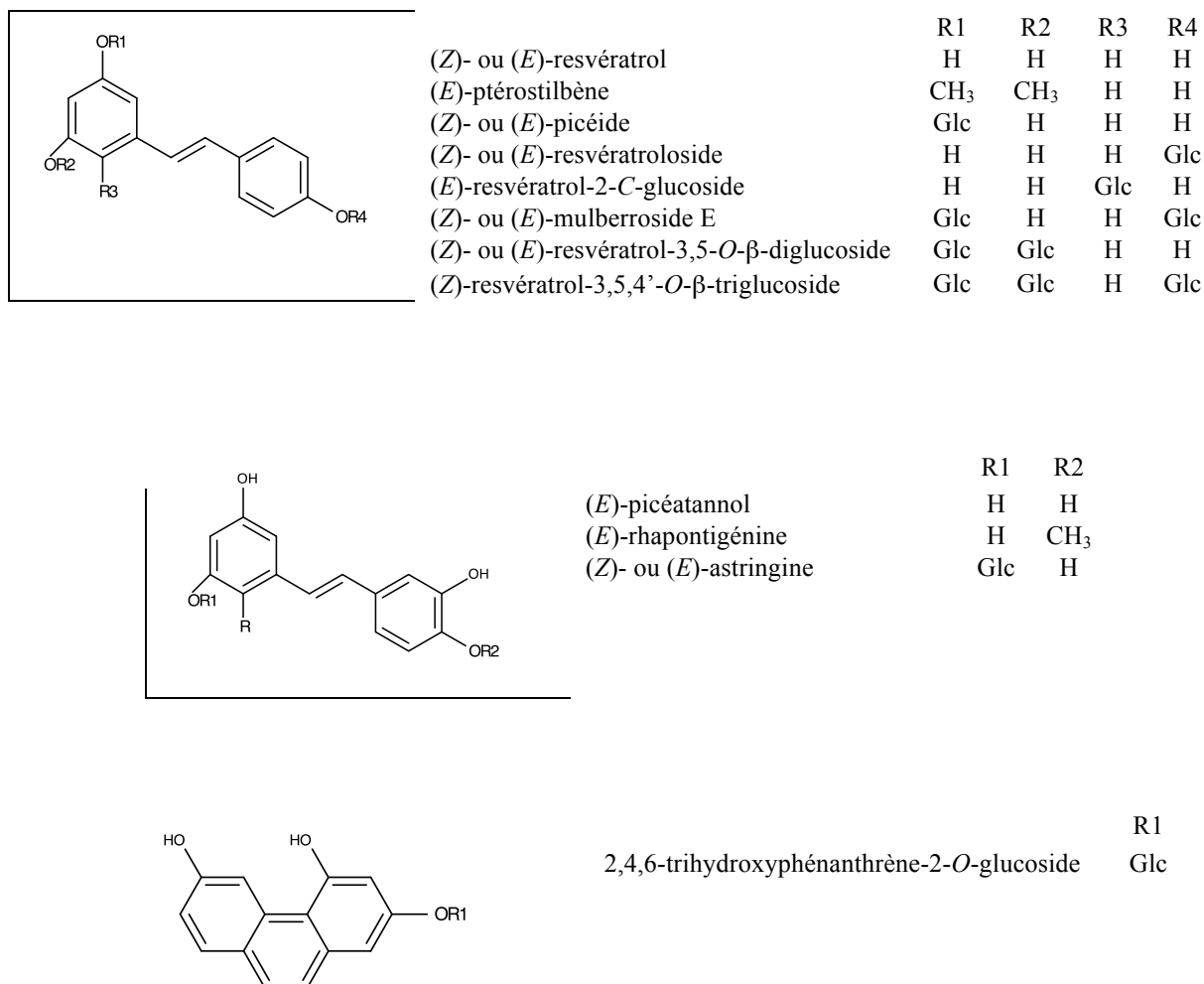
Les stilbènes synthases produisent les stilbènes à partir du *p*-coumaroyl-CoA chez les Angiospermes comme par exemple la vigne ou l'Arachide et à partir du cinnamoyl-CoA chez les Pinophytes, et plus particulièrement chez le genre *Pinus* (Chong *et al.*, 2009).

La STS connaît une dualité avec la CHS, toutes deux enzymes à l'origine des flavonoïdes. Elles utilisent le même substrat et présentent une forte homologie, entre 75 et 95 % à l'échelle des amino-acides et au moins 70 % au niveau de la protéine chez *Arachis hypogea* (Chong *et al.*, 2009 ; Jeandet *et al.*, 2010). Les réactions que chacune d'entre elles catalysent sont très proches, mais la cyclisation finale qu'elles induisent aboutit à deux composés très différents. La CHS forme une chalcone qui est un composé en C15 précurseur de la voie des flavonoïdes, la STS permet l'obtention du resvératrol. Ces deux enzymes ont été particulièrement étudiées depuis les années 1980 par l'équipe de Schröder de l'Université de Freiburg (Schröder *et al.*, 1988). Les chalcones synthases (CHS) sont des enzymes à l'origine des flavonoïdes et des anthocyanes, responsables de la couleur de nombreuses fleurs chez les Angiospermes (Tropf *et al.*, 1994), alors que les stilbènes synthases (STS) sont associées à un nombre moindre d'espèces végétales, qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à synthétiser les stilbènes.

La STS représente une enzyme importante chez la Vigne par son implication dans les mécanismes de défense naturelle des composés qu'elle permet de synthétiser. Au niveau du génome de *Vitis vinifera*, 43 gènes codant pour la STS ont été identifiés, dont une vingtaine avaient été déjà décrits comme étant exprimés (Jaillon *et al.*, 2007). Cette multiplication du nombre de copies, identiques ou non, laisse penser que l'étude des mécanismes régulant la synthèse du resvératrol est complexe. Il semble alors impossible d'envisager d'étudier les mécanismes de l'induction de la synthèse du resvératrol en se focalisant uniquement sur le comportement des gènes codant pour la STS.

De nombreux auteurs se sont toutefois penchés sur l'évolution de l'expression des gènes de la STS sous différentes conditions. Ainsi, l'accumulation des ARNm codant pour la STS a lieu en deux vagues successives. Ce comportement en deux temps de l'expression des gènes a pu être confirmé par deux vagues successives d'accumulation du resvératrol sur la feuille de Vigne après une induction par des UV-C (Jeandet *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010).

Par la diversité observée dans leurs structures, plus d'un millier de stilbènes sont découverts au sein des organismes. Dans la figure 11 on cite quelques exemples de monomères servant d'unités de base à la construction de dérivés et d'oligomères de stilbènes.



**Figure 11.** Structures des monomères de stilbénoides mis en évidence dans la Vigne (Pawlus *et al.*, 2012).

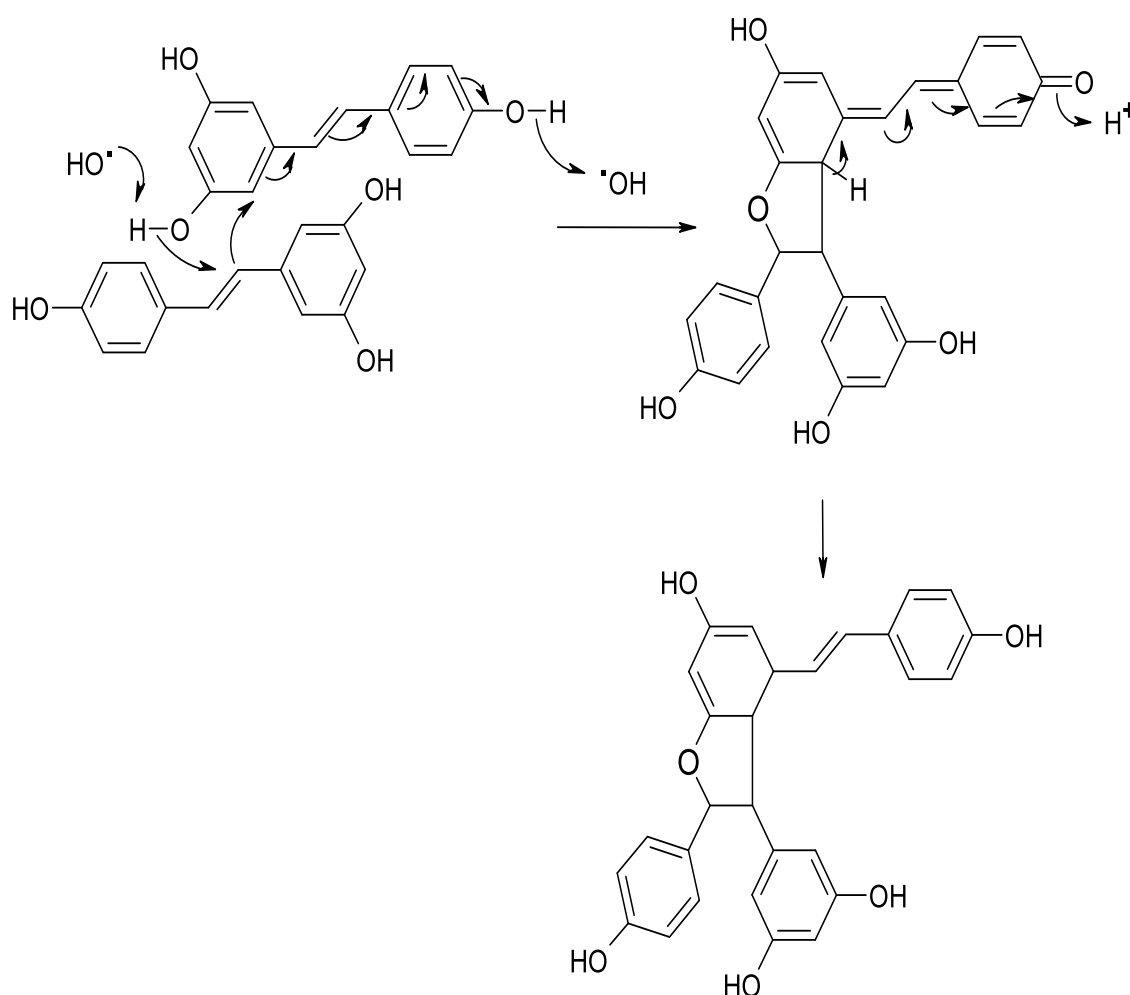
### 2.1.2. Les oligomères

Un grand nombre de stilbènes naturels sont des oligomères, qui comprennent des dimères, trimères, tétramères, etc. résultant du couplage oxydatif du resvératrol ou de ses dérivés. La diversité des stilbènes oligomériques et les mécanismes possibles conduisant à leur



formation ont été examinés (Morales *et al.*, 2000). Chez la Vigne, la dimérisation du resvératrol permet la formation d'oligomères : les viniférines. Deux viniférines sont bien caractérisées : l' $\epsilon$ -viniférine (un dimère de resvératrol) et l' $\alpha$ -viniférine (un trimère de resvératrol) (Jeandet *et al.*, 2002). Des enzymes potentiellement impliquées dans la formation des viniférines sont présentes à la fois chez les plantes et chez certains pathogènes (Mattivi *et al.*, 2011). La dimérisation du resvératrol a été obtenue *in vitro* avec une peroxydase de Raifort en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Langcake et Pryce, 1976).

Les peroxydases sont des enzymes très répandues chez tous les végétaux et sont capables de catalyser la formation de certains dimères (Pedreno *et al.*, 1992 ; Ros Barcelo *et al.*, 2003) (Figure 12).



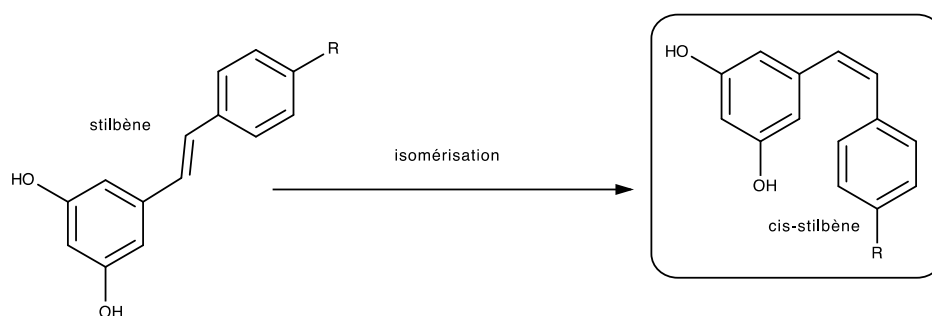
**Figure 12.** Oligomérisation (dimérisation) du resvératrol en *trans*- $\epsilon$ -viniférine, sous l'action d'une peroxydase (Jeandet *et al.*, 2002).

### 2.1.3. Dérivés des stilbènes

Les formes simples *trans* et *cis*-stilbènes peuvent être isomérées, méthylées, hydroxylées ou méthoxylées. Elles peuvent aussi être conjuguées avec des glucosides ou oligomérisées en structures plus complexes, amenant à une diversité importante de molécules (Shen *et al.*, 2009).

#### 2.1.3.1. Isomérisie

Les stilbènes peuvent subir une isomérisation de leur double liaison (**Figure 13**). Cette isomérisation de *cis* vers *trans* ou *trans* vers *cis* est influencée par différentes facteurs, l'énergie de l'irradiation, le type de milieu ou la température (Likhtenshtein, 2009).

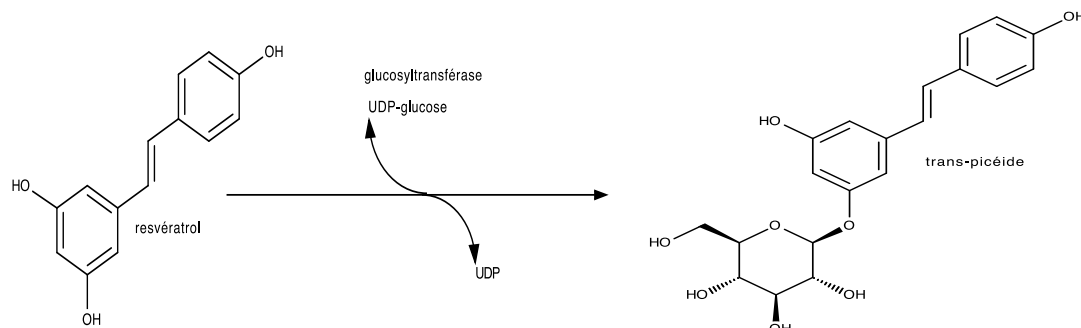


**Figure 13.** Exemple d'isomérisation d'(*E*)-stilbènes en (*Z*)-stilbènes.

#### 2.1.3.2. Glycosylation

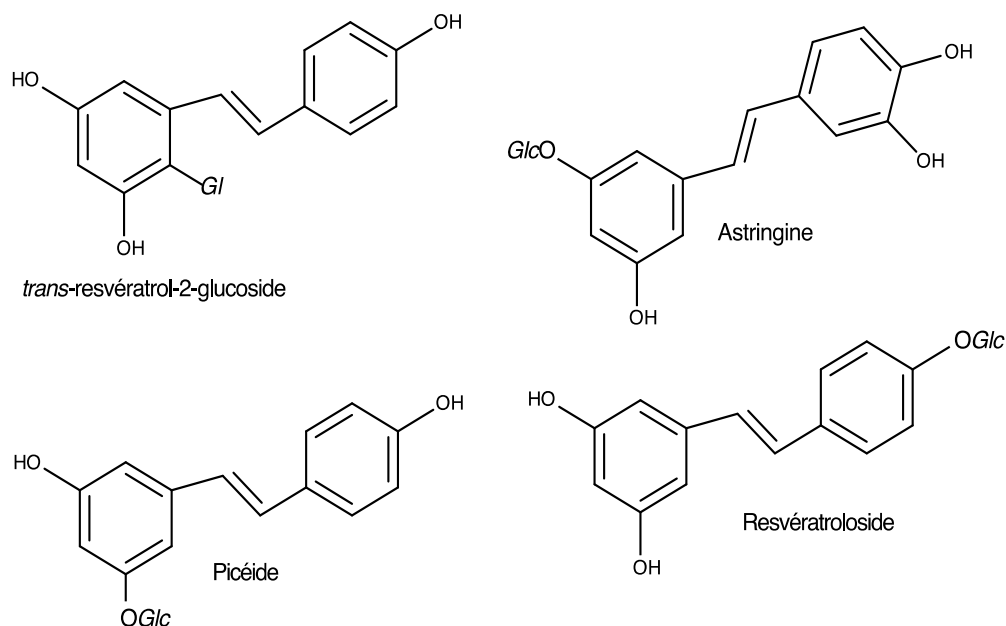
La glycosylation des métabolites secondaires est très courante et a pour but de détoxifier, réguler, stocker ou encore maintenir l'homéostasie de certains métabolites secondaires (Gachon *et al.*, 2005). La glycosylation des métabolites secondaires est réalisée par des glycosyltransférases (GT). Ces enzymes ne sont généralement pas considérées comme très spécifiques, puisqu'un seul gène peut produire une enzyme capable de glycosyler plusieurs substrats d'origines très différentes (Bowles *et al.*, 2005).

Les stilbènes ont également la capacité de subir une glycosylation. Chez la Vigne, les formes glycosylées, comme le picéide, se trouvent généralement dans les fruits, et constituent la forme majoritaire dans le jus de raisin (Chong *et al.*, 2009) (**Figure 14**).



**Figure 14.** Glycosylation du resvératrol par une glucosyltransférase.

UDP-glucose : uridine-diphosphate-glucose ; UDP : uridine diphosphate.



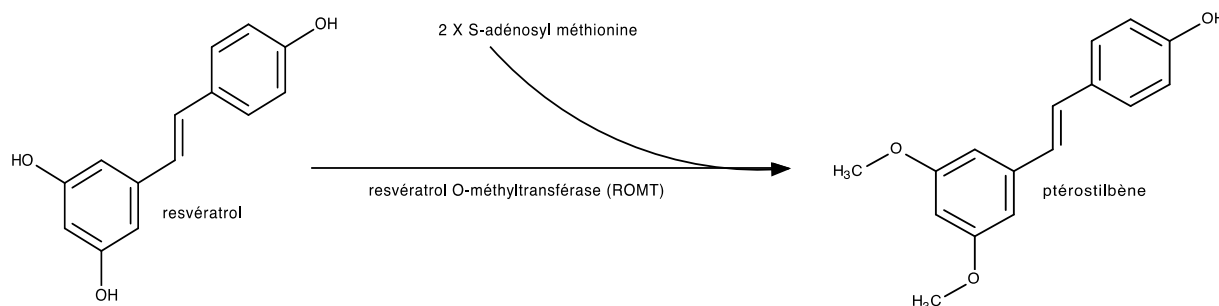
**Figure 15.** Exemples de stilbènes glycosylés.

### 2.1.3.3. Méthoxylation

La méthylation des stilbènes et d'un grand nombre de métabolites secondaires est réalisée par des *O*-méthyltransférases (OMT) *S*-adénosyl méthionine (SAM)-dépendantes de type I. Ces OMT catalysent la méthylation de groupements hydroxyles d'un grand nombre

de métabolites secondaires issus, en particulier, des phénylpropanoïdes, tels que les chalcones, les flavonoïdes, les isoflavonoïdes, les ptérocarpanes, ou les stilbènes (Noel *et al.*, 2003).

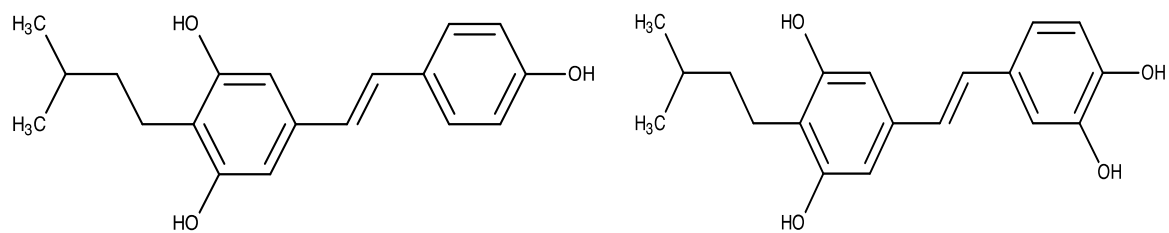
Les stilbènes ont la capacité de subir une méthoxylation comme c'est le cas pour deux molécules à forte activité pharmacologique : la combretastatine A4 (Kingston, 2009) et le ptérostilbène (3,5-diméthoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbène) (Roupe *et al.*, 2006). Il existe deux types d'enzymes capables de catalyser la méthylation des groupements hydroxy, les pinosylvine *O*-méthyltransférases (PMT) et les resvératrol *O*-méthyltransférases (ROMT) (Kingston, 2009). Par exemple, la méthylation du resvératrol par la resvératrol *O*-méthyltransférase (ROMT) (Schmidlin *et al.*, 2008) forme le ptérostilbène (3,5-diméthoxy-4'-hydroxy-*trans*-stilbène) (**Figure 16**).



**Figure 16.** Méthoxylation du resvératrol par la resvératrol *O*-méthyltransférase.

#### 2.1.3.4. Prénylation

Plusieurs dérivés de stilbènes prénylés ont été mis en évidence chez différentes familles végétales. Des formes prénylées de stilbènes (chiricanines) fongitoxiques ont été trouvées dans des racines de la Fabacée *Lonchocarpus chiricanus* (Ioset *et al.*, 2001). D'autres dérivés prénylés du resvératrol ont été caractérisés au niveau du mucilage qui entoure les jeunes racines d'Arachide (Sobolev *et al.*, 2006). Certaines études font état d'une prénylation non enzymatique de stilbène à partir d'isoprényl diphosphate (D'Abrosca *et al.*, 2005) (**Figure 17**).



**Figure 17.** Exemple de deux stilbènes prénylés

### 3. Les activités biologiques des stilbènes

Les stilbènes sont des métabolites secondaires présentant une potentialité de propriétés biologiques de par leur grande variabilité chimique pouvant dépendre du nombre d'unités de resvératrol, du nombre d'OH vicinaux, de la conformité spatiale des molécules. On se retrouve face à la même diversité chimique que celle des tanins catéchiques dont les propriétés dépendent largement du nombre d'unités. Les propriétés physicochimiques des stilbènes ont permis de mettre en évidence des propriétés biologiques majeures, pouvant avoir un impact bénéfique sur la santé humaine et végétale.

#### 3.1. Le rôle en santé humaine

Les polyphénols présentent de nombreuses activités biologiques. Ils sont tout d'abord connus pour leurs propriétés antioxydantes du fait de leur structure chimique ; ils sont d'excellents candidats pour le piégeage de radicaux libres (Haslam, 1996). Cependant, ces molécules sont également capables de moduler l'expression de gènes et des protéines impliqués dans différentes pathologies. Ces deux activités interviennent notamment dans la prévention des maladies cardiovasculaires, de certains cancers, des maladies neurodégénératives et métaboliques (Rodriguez-Mateos *et al.*, 2014).

##### 3.1.1. Les effets antioxydants

Les ROS (reactive oxygen species) sont des espèces obtenues par réduction du dioxygène et sont connues pour être impliquées dans de nombreuses pathologies, mais aussi dans les processus de vieillissement des cellules. Cependant, lorsqu'ils sont produits de façon excessive, les ROS sont fortement toxiques, induisant différents dommages tels qu'une dégradation de la membrane mitochondriale et l'altération oxydative de macromolécules biologiques comme les protéines, les lipides ou les acides nucléiques (Beaudeux *et al.*, 2006). Le resvératrol est capable de piéger les radicaux libres (Martinez et Moreno, 2000 ; Losa, 2003) et aussi d'activer les enzymes antioxydantes (Losa, 2003 ; Jang *et al.*, 1997).

### 3.1.2. Les effets biologiques au niveau neurologique

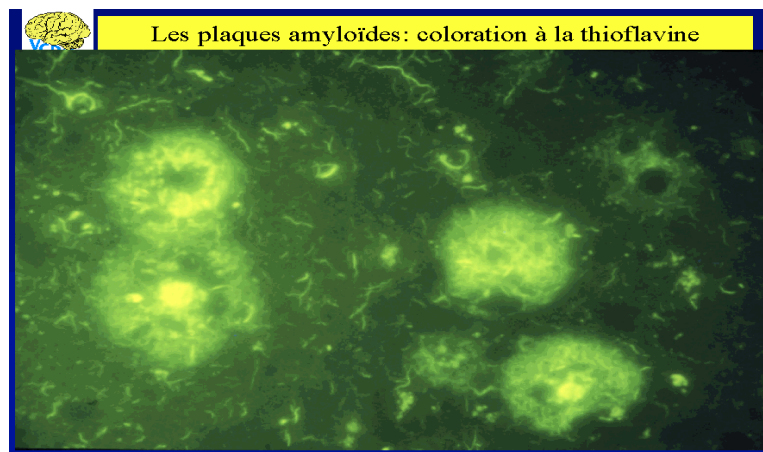
Parmi les nombreux effets biologiques des polyphénols, un a particulièrement attiré notre attention : l'effet neuroprotecteur qu'ils pourraient avoir envers certaines pathologies neurodégénératives (Mandel *et al.*, 2004 ; Weinreb *et al.*, 2004). Cela concerne entre autre la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative qui entraîne la perte progressive des fonctions mentales. C'est la principale maladie neurodégénérative responsable des démences chez les personnes âgées. Elle toucherait 25 millions de personnes dans le monde et près de 900 000 en France selon l'INSERM.

Une étude épidémiologique récente, réalisée notamment en Aquitaine sur environ 4 000 sujets de 65 ans et plus, a mis en évidence qu'une consommation modérée de vin (1/4 à 1/2 verre par jour) diminue l'incidence de démence sénile (70 % des cas de démence étant provoqués par la maladie d'Alzheimer). Le risque de développer une démence serait divisé par deux chez les buveurs modérés par rapport aux non buveurs (Orgogozo *et al.*, 1997).

L'une des caractéristiques de cette maladie est l'accumulation d'agrégats de  $\beta$ -amyloïdes extracellulaires entre les neurones (Rivière *et al.*, 2007). Ces agrégats pourraient entraîner une mort neuronale.

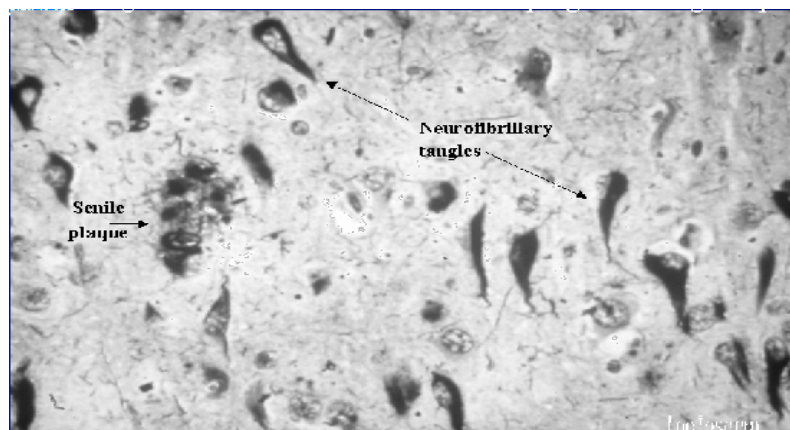
Les peptides  $\beta$ -amyloïdes sont issues du clivage de la  *$\beta$ -amyloides precursor protein* (APP) par des sécrétases. Ce peptide est « acide », en raison d'un pHi de 5,1 ; il est riche en glycine et en vanilline. La partie *N*-terminale (résidus 1 à 28) est hydrophile alors que la région *C*-terminale est hydrophobe (résidus 29 à 42). Cette région est enchâssée dans la membrane plasmique lorsque le peptide est incorporé dans le précurseur amyloïde (Bokvist *et al.*, 2004 ; Lynn et Meredith, 2000). Ces peptides peuvent être polymérisés en oligomères solubles quand ils sont produits en trop grand nombre, puis en fibrilles qui s'agrègent entre elles, constituant les plaques amyloïdes (Crouch *et al.*, 2008).

Les sources principales de cette inflammation sont la formation de plaques séniles constituée d'un dépôt extracellulaire de peptides  $\beta$ -amyloïdes (Mucke, 2009) (**Figure 18**) et d'une accumulation corticale de fer libérée par le cytochrome c.



**Figure 18.** Plaques amyloïdes au microscope électronique, colorées à la thioflavine, chez un sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (*in* <http://www.alzheimer-adna.com/>).

En effet, en présence d'ion ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), les peptides  $\beta$ -amyloïdes vont s'agréger en fibres amyloïdes toxiques dans le néocortex (**Figure 19**). Cette agrégation va entraîner la génération de radicaux libres qui vont induire la libération des cytokines pro-inflammatoires, endommageant la cellule via les microglies. Ce processus induit, par la suite, l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose et donc procéder à la destruction du neurone (Dumery *et al.*, 2001 ; Mandel *et al.*, 2004 ; Ono *et al.*, 2004 ; Weinreb *et al.*, 2004).

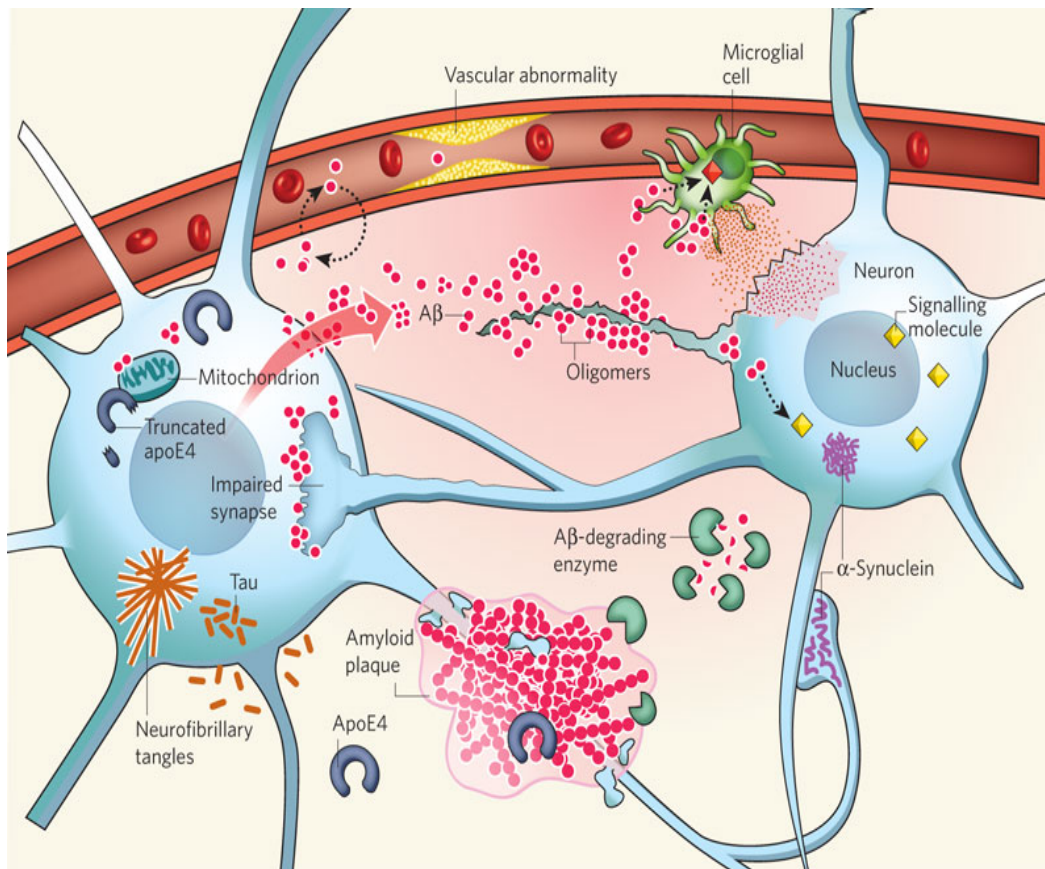


**Figure 19.** Agrégats amyloïdes sur le cortex cérébral au microscope électronique chez un sujet atteint de la maladie d'Alzheimer (*in* <http://www.alzheimer-adna.com/>).

L'agrégation des  $\beta$ -amyloïdes est considérée comme un événement critique dans la maladie d'Alzheimer (**Figure 20**). Cependant, de nombreux indices prouvent que ce sont les taux de  $\beta$ A soluble, et non les plaques, qui sont en corrélation avec les dysfonctionnements



cognitifs ; les formes solubles des  $\beta$ -amyloïdes seraient présentes dans le cerveau dès les stades précoces de la maladie (Mucke *et al.*, 2009).



**Figure 20.** Agrégation et accumulation des  $\beta$ -amyloïdes dans le cerveau, d'après Mucke (2009).

Ces oligomères solubles peuvent induire une cytotoxicité menant à une dégénérescence neuronale et deux voies sont possibles :

- cette toxicité peut être indirecte. En effet, ces oligomères peuvent activer des cellules microgliales induisant la synthèse et le relargage de facteurs inflammatoires tels que des cytokines, du monoxyde d'azote (NO), mais également des espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'accumulation de ces différentes molécules engendre des dommages au niveau des neurones (Block et Hong, 2005).
- cette toxicité peut être directe, les oligomères pouvant agir directement sur les neurones en induisant leur nécrose et / ou leur apoptose.

Les polyphénols, de par leurs propriétés complexantes, pourraient diminuer la formation de fibrilles en réduisant le taux de peptide amyloïde libre dans le cerveau (Lim *et al.*, 2001), en inhibant son agrégation (Mandel et Youdim, 2004 ; Weinreb *et al.*, 2004 ; Ono *et al.*, 2004) et en inhibant le dépôt des fibres sur le cortex cérébral (Ono *et al.*, 2004). Des études ont montré que les polyphénols du thé vert préviennent d'une part, indirectement, l'agrégation des  $\beta$ -amyloïdes par l'inhibition de l'accumulation corticale de fer (Mandel *et al.*, 2004 ; Weinreb *et al.*, 2004), et d'autre part, ils avantagent la voie de l' $\alpha$ -sécrétase qui clive l'APP en amyloïde non toxique par rapport à la voie pathologique (Mandel *et al.*, 2004).

De plus, les études de Lim *et al.* ont montré que la curcumine, un polyphénol du curry, réduit les effets inflammatoires des fibres amyloïdes par réduction de la concentration en  $\beta$ -amyloïdes libres dans le cerveau (Lim *et al.*, 2001).

Récemment, d'une part, l'équipe d'Ono (Ono *et al.*, 2004) a montré une inhibition dose dépendante de la formation et de l'extension des fibres amyloïdes par les polyphénols du vin (quercétol) et du curry (curcumine). D'autre part, des chercheurs ont observé sur des cultures primaires de neurones issus de l'hippocampe qu'un extrait polyphénolique de myrtilles peut inhiber l'action du  $\beta$ A sur la viabilité cellulaire via la diminution des ROS intracellulaires (Joseph *et al.*, 2010). Tarozzi *et al.* (2010) ont mis en évidence que la cyanidine-3-*O*-glucoside diminue les phénomènes nécrotiques et apoptotique induits par le  $\beta$ A dans des cultures de neurones humains.

Parmi les polyphénols, le resvératrol, molécule de base des stilbènes, est une molécule particulièrement active. Il est considéré comme un composé neuroprotecteur de par ses activités antioxydantes et anti-agrégante. Ainsi, Feng *et al.* (2009) ont montré que le resvératrol pourrait directement se lier aux A $\beta$ 42, interférer dans leur agrégation, changer la conformation des oligomères et ainsi atténuer la cytotoxicité de ces oligomères. Le resvératrol et ses dérivés pourraient donc être une parade à la maladie d'Alzheimer en limitant ses effets. Il est capable d'inhiber la cytotoxicité induite par  $\beta$ A sur des neurones en culture, en inhibant les variations du potentiel membranaire et en diminuant l'accumulation des ROS intracellulaires, ainsi que plusieurs marqueurs d'apoptose, comme la fragmentation de l'ADN et le ratio Bax/Bcl-2 (Jang et Surh, 2003). De plus, Chen *et al.* (2005) ont mis en évidence l'induction de l'expression de gènes codant des enzymes antioxydantes, comme la HO-1, par le resvératrol sur des neurones en culture. Les auteurs suggèrent que cette induction se fait via l'activation du facteur de transcription Nrf2. Au sein de notre laboratoire, Rivière *et al.* (2009)

ont montré que le resvératrol et le picéide sont capables d'inhiber l'agrégation du peptide amyloïde *in vitro*.

### 3.1.3. Les effets bénéfiques vis-à-vis du cancer

Le développement d'un cancer est un processus lent, constitué de plusieurs phases (initiation, promotion, progression et invasion) dans lesquelles les radicaux libres oxygénés et des composés carcinogènes jouent un rôle primordial : ils modifient la structure et l'expression de certains gènes dont le rôle est de contrôler le fonctionnement normal de la cellule (Suschetet *et al.*, 1996 ; Alberts *et al.*, 1999). Par leur action antioxydante puissante, les polyphénols pourraient donc produire leur effet anti-cancer.

Etant donné les propriétés anticancéreuses connues de certains polyphénols et leur présence générale chez les végétaux, ces complexes considérés comme des agents chimiopréventifs, pourraient à nouveau être à l'origine des effets bénéfiques observés.

Des résultats très intéressants ont été trouvés par l'équipe américaine de Clifford (1996) en utilisant des souris transgéniques prédisposées à développer spontanément des tumeurs semblables à la neurofibromatose humaine. L'incorporation de vin rouge dans la diète, apportant 0,04 % de polyphénols (ce qui représente approximativement un quart de la concentration d'une diète classique), retarde de façon considérable le développement des tumeurs chez ces souris. Ces auteurs suggèrent que des composés polyphénoliques du vin rouge, comme la catéchine, pourrait être responsable de cet effet protecteur contre la carcinogenèse.

Il apparait donc que les polyphénols du vin possèdent potentiellement de nombreuses activités biologiques, mais ce qui fait le plus défaut, c'est une preuve définitive de la résorption effective des polyphénols chez l'homme et de leur biodisponibilité lorsqu'ils sont apportés par l'alimentation normale, c'est-à-dire accompagnés de tout le bol alimentaire.

Environ 150 études épidémiologiques montrent que la consommation régulière de fruits et légumes est associée avec une diminution du risque de cancer (Block *et al.*, 1992). Quelques autres études épidémiologiques, réalisées aux Etats-Unis, montrent qu'une consommation modérée de vin diminue (ou n'augmente pas), contrairement aux autres boissons alcoolisées, le risque des cancers aéropharyngé et du poumon (Blot *et al.*, 1988 ;

MacFarlane *et al.*, 1995 ; Longnecker *et al.*, 1995). En France, on observe aussi un minimum de risque de cancer suite à une consommation modérée de vin (Renaud et Gueguen, 1998).

Il existe deux types d'agents chimiopréventifs. Les agents bloquants qui inhibent l'initiation et les agents suppresseurs qui empêchent l'expression de cellules malignes aux stades promotion ou progression. Le resvératrol présente ces deux qualités et a ainsi d'une part, une activité anti-initiation et d'autre part, une activité anti-promotion et anti-prolifération. Le resvératrol agit sur la carcinogénèse en présentant des actions au niveau des trois stades de ce processus : la phase d'initiation, la phase de promotion et la phase de progression. De plus, le resvératrol supprime les phases finales de la carcinogénèse telles que l'angiogénèse et les métastases (Delmas *et al.*, 2006). Le resvératrol joue un double rôle car il peut prévenir de la formation de cancers mais permet aussi de lutter contre un cancer déjà déclaré (Kundu et Surh, 2008). A faible dose, le resvératrol a la propriété de potentialiser l'effet des chimiothérapies traditionnelles (Delmas *et al.*, 2006)

De plus, plusieurs travaux montrent que l'(*E*)-resvératrol inhibe la prolifération de cellules tumorales (Magbonyebi *et al.*, 1998 ; Elattar et Virgi, 1999) et aussi les activités de protéines kinases (Jayatilake *et al.*, 1993). Récemment, l'activité chémopréventive du (*E*)-resvératrol a été établie dans divers essais où les trois étapes majeures de la carcinogénèse sont impliquées (Jang *et al.*, 1997 ; Jang et Pezzuto, 1998, 1999).

#### **3.1.4. Les effets biologiques au niveau cardiovasculaire**

Les stilbènes, et plus particulièrement le resvératrol, ont un effet préventif sur l'agrégation des plaquettes sanguines pouvant être à l'origine d'infarctus du myocarde (Bertelli *et al.*, 2009). Des extraits de vin et de raisin ont également montré un effet bénéfique sur la réduction du processus d'athérosclérose (Wang *et al.*, 2005), du processus de peroxydation des lipides (Fuhrman *et al.*, 1995) et d'agrégation de plaquettes (Seigneur *et al.*, 1990 ; Demrow *et al.*, 1995).

Il a été montré que les polyphénols pouvaient réduire l'oxydation des LDL (lipoprotéines de basse densité), diminuer l'expression des protéines d'adhésion synthétisées par les cellules endothéliales (qui facilitent donc la transformation des monocytes en macrophages) et limiter la prolifération et la division des CML (cellules musculaires lisses).

Cela aurait pour effet de limiter les dégâts (impliquant les LDL oxydés) du « mauvais cholestérol » et d'entraîner une baisse des maladies cardiovasculaires en prévenant celles-ci.

Certains polyphénols du vin peuvent exercer d'autres activités au niveau vasculaire :

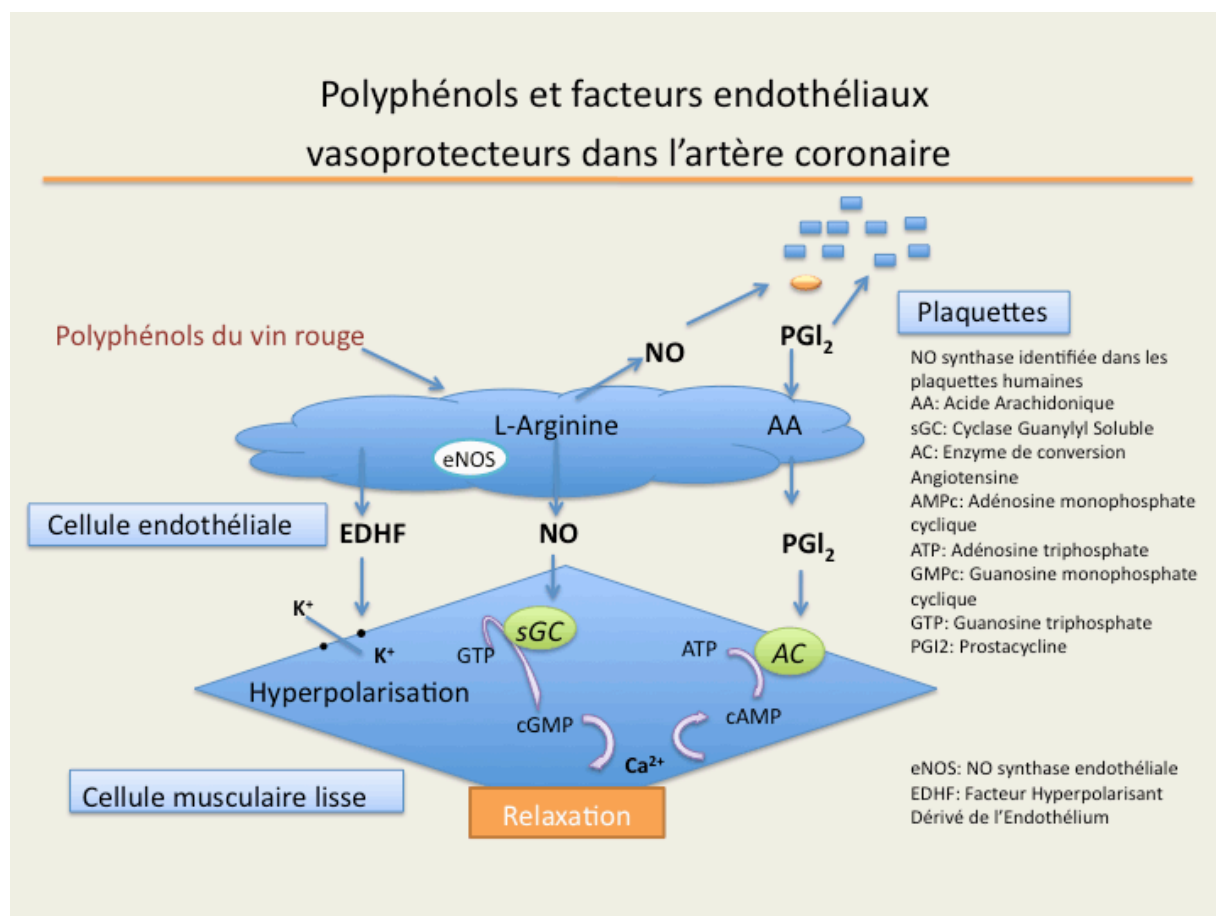
- inhiber *in vitro* les enzymes qui dégradent les principaux éléments structuraux de la matrice extravasculaire (Ijima *et al.*, 2000).
- induire une vasorelaxation par l'intermédiaire de la voie NO-GMPc (Fitzpatrick *et al.*, 1993 ; Andriambeloson *et al.*, 1997).

Ces différentes activités biologiques complémentaires *in vitro* pourraient expliquer le rôle essentiel des polyphénols du vin rouge dans la protection de certaines populations vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, ainsi que les études épidémiologiques l'ont clairement fait ressortir.

Quelques expériences ont été réalisées *in vivo* chez l'animal pour mettre en évidence des effets cardioprotecteurs, par ingestion de vin rouge comparativement à l'ingestion d'eau, de vin blanc ou d'autres boissons alcoolisées. Le vin rouge semble réduire spécifiquement l'athérosclérose expérimentale chez le Lapin (Klurfeld et Krichewsky, 1981). Les études chez l'Homme sont contradictoires, car elles ne reproduisent pas toutes les effets bénéfiques du vin rouge (comparativement au vin blanc) en ce qui concerne l'oxydabilité des LDL, la capacité antioxydante du sérum, la réactivité des plaques et le HDL cholestérol.

Les polyphénols tels que les flavonoïdes du vin apportent des activités antiagrégantes plaquettaires, vasodilatatrices et anti-inflammatoires. Chez l'homme, il est établi que les cellules endothéliales ont un rôle qui détermine le contrôle de l'homéostasie vasculaire. L'effet protecteur des cellules endothéliales est déterminé par leur capacité à libérer des facteurs vasoactifs tels que le monoxyde d'azote (NO), le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) et la prostacycline. Le facteur NO, en plus de son rôle vasodilatateur, présente un rôle inhibiteur de la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (**Figure 21**).

Des effets vasodilatateurs d'extraits phénoliques de vin et de composés d'anthocyanes sont impliqués dans la synthèse de NO et ont été observés *in vitro* (Stoclet *et al.*, 1999). Dans un test contenant 16 vins rouges, le contenu total en phénols s'est avéré fortement corrélé avec l'activité antioxydante et la capacité vasodilatatrice (Burns *et al.*, 2000).



**Figure 21.** Effets vasodilateur des polyphénols du vin rouge et facteurs endothéliaux vasoprotecteurs dans l'artère coronaire (d'après Teissèdre, 2013).

### 3.2. Le rôle des stilbènes en santé végétale

Les stilbènes s'accumulent de façon constitutive dans le bois et l'écorce de certaines plantes ligneuses et en moindre quantité dans les tissus verts, le plus souvent conjugués à des glycosides ou à des groupements méthyles (Hart, 1981). De par leur présence constitutive, les stilbènes sont souvent considérés comme des phytoanticipines, terme donné aux composés de défense naturellement synthétisés et accumulés dans les plantes. En dehors de leur présence constitutive dans les parties ligneuses ou les racines d'un certain nombre de plantes, les stilbènes sont également connus en tant que composés de défense, inductibles suite à un stress

et sont alors considérés comme des phytoalexines, qui présentent deux effets puissants en santé végétale : antifongiques et allélopathiques.

### 3.2.1. Les effets antifongiques et allélopathiques

Les stilbènes sont des phytoalexines : elles aident à la défense de la plante lors d'agressions biotiques ou abiotiques (Langcake et Pryce, 1976).

Ces composés présentent des activités antifongiques, jouent un rôle important dans les mécanismes de défense : des études ont montré que la Vigne tente de se défendre contre les pathogènes agressifs par une induction importante de la production de stilbènes (Lambert, 2011). Ils sont impliqués aussi dans la défense de la Vigne par leur capacité à inhiber la germination des spores et la croissance de champignons pathogènes (Pezet et Pont, 1988).

Chez la Vigne, les formes *cis* et *trans* du resvératrol s'accumulent dans la peau (épicarpe) des baies en cours de maturation (Jeandet *et al.*, 1991 ; Versari *et al.*, 2001), et ils sont supposés former une barrière constitutive naturelle des baies contre les nombreux champignons et bactéries phytopathogènes qui se développent préférentiellement à ce stade de développement (Gatto *et al.*, 2008). De ce fait, la faible teneur en stilbènes observée durant la maturation de la baie de raisin semble responsable de la vulnérabilité de la Vigne à l'attaque de nombreux champignons, entraînant ainsi des pertes économiques importantes.

Les stilbènes présentent des effets allélopathiques. Les composés de l'extrait méthanolique de *Carex distachya* (Fiorentino *et al.*, 2008b) ont des effets allélopathiques positifs et négatifs selon les composés considérés.

### 3.2.2. Les effets insecticide et dissuasifs

Un effet insecticide a été rapporté pour les stilbènes extraits de l'écorce de *Yucca periculosa*. Ces stilbènes inhibent la croissance et le développement d'un insecte ravageur du Maïs (Torres *et al.*, 2003). L'Aulne crispé accumule la pinosylvine 3-*O*-méthyl éther au niveau des bourgeons foliaires et des chatons, ce qui semble avoir un effet dissuasif sur le Lièvre d'Amérique (Bryant *et al.*, 1983).

### 3.3. Utilisation des stilbènes dans les cosmétiques

La firme cosmétique Caudalie exploite directement les qualités antioxydantes des polyphénols de la Vigne, et particulièrement des stilbènes tels que le resvératrol et les viniférines pour la création de produits cosmétiques réputés anti-vieillesse. La recherche Caudalie a montré également que le resvératrol de la Vigne possède non seulement une efficacité contre le stress carbonyle mais également une biodisponibilité cutanée grâce à sa stabilisation par l'acide oléique (Caudalie.com/brevets-actifs, 2014). En France notamment, plusieurs entreprises commercialisent des produits cosmétiques à base de resvératrol issu de l'extraction de sarments de vigne. C'est le cas de Dior, pour le groupe LVMH, ou de Caudalie. Des brevets sur l'extraction et la stabilisation du resvératrol ont été déposés par ces entreprises (Vercauteren *et al.*, 2006 (Caudalie) ; Andre et Renimel, 2007 (LVMH Recherche)). D'autres firmes dans le monde utilisent aussi du resvératrol dans leurs produits, comme l'entreprise américaine Estée Lauder

## 4. Les Cypéracées

### 4.1. Description générale

Les Cypéracées sont une famille botanique de l'ordre des Poales répandue à travers le monde. Ce sont des plantes monocotylédones herbacées en touffe, souvent vivaces. Elles peuplent de préférence les lieux humides et marécageux du monde entier, mais aussi bien d'autres milieux naturels. Elles croissent sur le bord des eaux, sur les plages maritimes, dans les prairies humides, plus rarement dans les terrains sablonneux arides.

Les Cypéracées se distinguent nettement des Poacées par leurs tiges aériennes dépourvues de nœuds, par la concrescence en tube des gaines foliacées, par les anthères basifixes et par la nature du fruit.

L'espèce la plus connue est le Papyrus, *Cyperus papyrus*, dont les Egyptiens utilisaient la moelle comme support d'écriture, les papyrus (**Figures 22 et 23**). Cette espèce a été utilisée pendant longtemps comme matière première pour fabriquer une forme de papier également dénommé papyrus qui était le support d'écriture le plus important de l'Antiquité.





**Figure 22.** Papyrus, *Cyperus papyrus* (photographie Dr Alain Badoc).



**Figure 23.** Feuilles de papyrus fabriquées à partir de *Cyperus papyrus* (photographie Dr Alain Badoc).

#### 4.1.1. Appareil végétatif

Les Cypéracées sont des herbes ordinairement vivaces, à souche souterraine constituée par des rhizomes rameux. Les tiges aériennes sont non ramifiées, dépourvues de nœuds renflés, pleines et souvent triangulaires. Les feuilles sont tristiques, composées d'une gaine dont les bords sont presque toujours concrescents dans toute leur longueur en un tube fermé, et d'un limbe linéaire plus ou moins canaliculé, très rarement pourvu d'une ligule.

#### 4.1.2. Appareil reproducteur

Les fleurs, hermaphrodites ou unisexuées, sont solitaires à l'aisselle de petites bractées écailleuses, distiques ou multifariées, réunies en petits groupes dont l'ensemble constitue un épillet. Les épillets sont groupés à l'extrémité des tiges en épis, en grappes simples ou composées ou en ombelles. La fleur est dépourvue de périanthe, mais dans certains cas est accompagnée à sa base d'un nombre variable d'écailles ou de soies. L'androcée se compose le plus souvent de trois étamines hypogynes, à filets filiformes, à anthères basifixes et intorses. L'ovaire, uniloculaire et uniovulé, devient à maturité un akène à péricarpe membraneux ou crustacé, contenant une seule graine, dont l'embryon très petit, lenticulaire ou turbiné, est pourvu d'un albumen amylicé abondant.

#### 4.1.3. Les principaux genres

Il existe environ 110 genres de Cypéracées, dont les trois principaux sont les *Carex* ou Laiches (environ 1760 espèces), les *Cyperus* ou Souchets (environ 600 espèces, dont *C. papyrus*, le Papyrus et *C. esculentus* le Souchet comestible qui fournit l'orgeat de souchet) et les *Scirpus* ou Scirpes (environ 300 espèces, dont *S. lacustris*, le Jonc des chaisiers). Cette famille a été relativement peu explorée chimiquement jusqu'à présent, du fait des difficultés de culture (une bonne irrigation est souvent nécessaire pour le développement des racines). On s'est donc contenté d'espèces cultivées au jardin botanique de Talence ou rencontrées en Gironde à l'état sauvage. Une difficulté importante a été la période de l'année : les récoltes en hiver permettent difficilement la reconnaissance des spécimens en absence de fructifications.

#### 4.2. Les stilbènes des Cypéracées

Les premiers travaux concernant les stilbènes des Cypéracées semblent être ceux de Suzuki *et al* (1987) portant sur *Carex fedia* Nees var. *miyabei* : il a été montré la présence d' $\epsilon$ -viniferine et de nouveaux dérivés du resvératrol (**Tableau 1**) : miyabénols C (trimères), miyabénols A et B (tétramères). La présence de ces deux derniers a été confirmée par Kawabata *et al.* en 1995 à partir des racines et des rhizomes de *Carex pumila*, 3 oligostilbènes ont été isolés :  $\epsilon$ -viniferine, miyabénol C et A (Kurihara *et al.*, 1990). Des oligomères

stilbéniques ont été trouvés chez d'autres espèces de *Carex* (*C. foliosissima*, *C. morrowii*, *C. multifolia* et *C. ciliato-marginata*) dont trois ont été identifiés :  $\alpha$ -viniférine, pallidol et kobophénol A (Senda *et al.*, 1995). Chez *Carex* la présence de *cis*-miyabénol A, *cis*-miyabénol C et de kobophénol B a été démontrée dans les semences (Meng *et al.*, 2001). De même, la présence de 16 polyphénols, dont trois dérivés du resvératrol, a été décelée dans les racines de *Carex distachya* (Fiorentino *et al.*, 2008c). Deux oligomères de resvératrol (pallidol et kobophénol A, respectivement dimère et trimère de resvératrol) et cinq flavonoïdes (*Carex folliculata*) ont été trouvés dans les akènes (Li *et al.*, 2009).

Des premiers essais en mai 2007 avaient montré au GESVAB la présence de stilbènes en quantité non négligeable chez certaines espèces de *Carex*.

**Tableau 1** : Stilbènes découverts chez différentes espèces de *Carex*.

<b>Espèces analysées</b>	<b>Composés</b>	<b>Références</b>
<i>Carex distachya</i>	carexanes A, B, distachyasine	D'Abrosca <i>et al.</i> , 2005 ; Fiorentino <i>et al.</i> , 2006abc, 2008ac
<i>Carex dolichostachya</i> subsp. <i>dolichostachya</i> (= <i>C. multifolia</i> )	kobophénol A, pallidol, (+)- $\alpha$ -viniférine	Senda <i>et al.</i> , 1995
<i>Carex foliosissima</i>	kobophénol A, pallidol, (+)- $\alpha$ -viniférine	Senda <i>et al.</i> , 1995
<i>Carex folliculata</i>	kobophénol A, pallidol, <i>trans</i> -miyabénol C, $\alpha$ -viniférine	Li <i>et al.</i> , 2009 ; Gonzalez-Sarrias <i>et al.</i> , 2011
<i>Carex humilis</i>	$\alpha$ -viniférine	Lee <i>et al.</i> , 1998
<i>Carex kobomugi</i>	gnétine F, kobophénols A, B, miyabénols A, B, C, 3-viniférine	Kawabata <i>et al.</i> , 1989 ; Kurihara <i>et al.</i> , 1990, 1991
<i>Carex miyabei</i> (= <i>C. fedia</i> )	miyabénols A, B	Suzuki <i>et al.</i> , 1987
<i>Carex morrowii</i>	kobophénol A, pallidol, (+)- $\alpha$ -viniférine	Senda <i>et al.</i> , 1995
<i>Carex pendula</i>	kobophénol B, miyabénols A, C	Meng <i>et al.</i> , 2001
<i>Carex pumila</i>	hopéaphénol, kobophénol B, miyabénols A, B	Kawabata <i>et al.</i> , 1991 ; Kawabata <i>et al.</i> , 2009
<i>Carex siderosticta</i> var. <i>pilosa</i> (= <i>C. ciliatomarginata</i> )	kobophénol A, pallidol, (+)- $\alpha$ -viniférine	Senda <i>et al.</i> , 1995
<i>Carex vulpinoidea</i>	hopéaphénol	Nielsen <i>et al.</i> , 2012

D'autres genres de Cypéracées renferment aussi des stilbènes (**Tableau 2**). On y trouve des oligostilbènes dans plusieurs genres : dimères, trimères, tétramères et des prénystilbènes.

**Tableau 2 :** Stilbènes découverts chez différentes espèces de Cypéracées autres que les Laïches.

Espèces analysées	Composés	Références
<i>Bolboschoenus maritimus</i> (= <i>Scirpus maritimus</i> )	picéatannol, resvératrol, scirpusines A, B	Powell, 1987
<i>Bolboschoenus fluviatilis</i> (= <i>Scirpus fluviatilis</i> )	scirpusines A, B	Nakajima, 1978
<i>Bolboschoenus yagara</i> (= <i>Scirpus yagara</i> )	<i>trans</i> -resvératrol, scirpusines A, B, sciryagarols I, II	Yang <i>et al.</i> , 2008, 2010 ; Liang, 2013
<i>Cyperus conglomeratus</i>	2-prenyl-3,4'-dihydroxy-5-méthoxystilbène	Basaif, 2003
<i>Cyperus longus</i>	longusols A, B, C, longusone A, picéatannol, <i>trans</i> -scirpusines A, B	Morikawa <i>et al.</i> , 2002 ; Morikawa, 2010
<i>Cyperus rotundus</i>	cassigarol E, (+) et (-)-(E)-cyperusphénol A, (E)-mesocyperusphénol A, picéide, <i>trans</i> -scirpusines A, B	Ito <i>et al.</i> , 2012ab ; Tran <i>et al.</i> , 2014
<i>Cyperus stoloniferus</i>	picéatannol, resvératrol	Chau <i>et al.</i> , 2013
<i>Kobresia nepalensis</i>	népalensinol A, B, C	Nozaki, 1997 ; Yamada <i>et al.</i> , 2006
<i>Schoenoplectus californicus</i> (= <i>Scirpus californicus</i> )	picéatannol, scirpusines A, B	Schmeda-Hirshmann <i>et al.</i> , 1996
<i>Schoenus nigricans</i>	3,5,4'-triméthoxy-stilbène	Dawidar <i>et al.</i> , 1994 ; Chabert <i>et al.</i> , 2006
<i>Scirpoides holoschoenus</i> (= <i>Scirpus holoschoenus</i> )	2-prényl-3,5,4'-triméthoxystilbène	Abdel-Mogib <i>et al.</i> , 2001



**Figure 24.** Exemple d'un *Carex*, parties aériennes de *Carex hirta* (photographie Dr Alain Badoc).



**Figure 25.** Exemple d'un *Carex*, parties aériennes et souterraine de *Carex cuprina* (photographie Dr Alain Badoc).

# Matériel et Méthodes

## **1. Matériel végétal**

Ce travail a été effectué sur diverses parties de plantes de la famille des Cypéracées : parties souterraines, tiges, feuilles et semences. La récolte a été réalisée en fonction des quantités de matériel végétal qui sont disponibles et suffisantes dans la nature en Gironde, dans les jardins botaniques de Bordeaux et de Talence et à partir de plantes issues du commerce (**Tableau 3**).

Les plantes récoltées ont été lavées abondamment afin de les débarrasser de la terre. Les différentes parties ont été séparées : parties souterraines avec parfois séparation des rhizomes et des racines, parties végétatives avec parfois distinction des feuilles, feuilles inflorescentielles, tiges et enfin semences. Les échantillons ont été conservés en chambre froide à -20°C dans des sachets hermétiques en plastique à fermeture rail de 10 x 15 cm.

Dans un premier temps nous nous sommes focalisés sur les parties souterraines du genre *Carex*, différentes études sur les Cypéracées ayant signalé leur richesse en stilbènes. Dans un second temps, l'étude analytique a concerné d'autres parties : feuilles, tiges, semences.



**Tableau 3.** Espèces étudiées (JB = Jardin botanique)

Esèce	Récolté le	Lieu de récolte	Code JB Talence	Précisions sur la provenance	Partie
<i>Carex acuta</i> L. Laiche aigüe	25 01 2011	JB Talence	TAL20090301	JB Caen IS 2008-2009/563, récolté 20 07 2008 au JB	souterraine aérienne
<i>Carex annectens</i> (E.P.Bicknell) E.P.Bicknell Laiche à gaine tronquée	27 01 2011	JB Bordeaux	TAL20110116	JB Bordeaux, récolté Alain Badoc	souterraine
<i>Carex arenaria</i> L. Laiche des sables	20 09 2012	JB Talence	FR-0-TAL- 20100920W	Pointe d'Arcachon, dune blanche, récolté Alain Badoc	souterraine aérienne
<i>Carex buchananii</i> Berggr. Laiche de Buchanan	31 01 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110124G	achat 29 01 2011 Jardinerie du quai, 2 ter quai de la mégisserie, Paris, ex Kerisnel, Angers	souterraine feuille
<i>Carex brunnea</i> Thunb. 'Variegata' Laiche brune 'Variegata'	16 02 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110206G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann Cascade www.xtrr.nl, lela 070128 F1671328	souterraine feuilles
<i>Carex bohemica</i> Schreb. Laiche de Bohème	15 07 2013	JB Talence	TAL20110338	ex Goethe Universität Frankfurt am Main IS 2011 XX-0-FRT-1994/545 ex JB Münich	souterraine
<i>Carex brevicollis</i> DC. Laiche à bec court	29 11 2013	JB Talence	TAL20120352	ex JB Latvia University IS 2010-2011/64	souterraine aérienne
<i>Carex capillacea</i> Boott Laiche capillacée	11 01 2010	JB Talence	TAL20080609	ex Palmengarten IS 2007/151 NZ-0-FRP- 15962, leg. U. McHardy, Nouvelle-Zélande	souterraine
<i>Carex comans</i> Berggr. 'Bronze Form' Laiche cuivrée	16 02 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110207G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann	souterraine feuilles
<i>Carex colchica</i> J.Gay. Laiche de la Loire	17 09 2013	JB Talence	TAL20110411	ex JB Vácrátót Hongrie IS 2010/333 ' <i>Carex ligerica</i> Gay'	souterraine

<i>Carex comosa</i> Boott Laiche à toupet	06 12 2013	JB Montréal	TAL20120304	ex JB Montréal IS 2011/354 Canada, Québec, MRC Argenteuil, Mille-Isles, marais vers 215 m, 45°47'40.49"N, 74°9'38.5"W, récolté M.J. Bernard, F. Coursol, R. Gaudette 24 10 2011	souterraine aérienne
<i>Carex cuprina</i> (Sándor ex Heuff.) Nendtv. ex A.Kern. Laiche d'Otruba "" <i>muricata</i> ""	11 06 2010	Pessac, Gironde		récolté Alain Badoc campus universitaire de Pessac	souterraine aérienne
<i>Carex cuprina</i> (Sándor ex Heuff.) Nendtv. ex A.Kern. Laiche d'Otruba "" <i>vulpina</i> ""	11 06 2010	JB Talence	FR-0-TAL- 20070520W	ex bois de Thouars, Talence, Gironde, récolté Alain Badoc 03 05 2007	souterraine aérienne
<i>Carex cuprina</i> (Sándor ex Heuff.) Nendtv. ex A.Kern. Laiche d'Otruba ""CPC""	13 02 2012	JB Talence	TAL20090304	ex JB Caen IS 2008-2009/584 récolté 03 07 2008 SU Site Urbain site préservé à dominance calcaire	souterraine
<i>Carex divulsa</i> Stokes Laiche écartée	11 06 2010	JB Talence	FR-0-TAL- 20020728W	sauvage dans rocaille du Jardin botanique	souterraine aérienne
<i>Carex dissita</i> Tim. Laiche découpée	21 11 2013	JB Talence	TAL20110321	ex JB Nantes, IS 2011/449 01-1046s*	souterraine aérienne
<i>Carex elata</i> All. subsp. <i>elata</i> Laiche élancée	27 01 2011	JB Bordeaux	TAL20110117	récolté Badoc Alain	souterraine
<i>Carex flacca</i> Schreb. subsp. <i>flacca</i> Laiche glauque	11 06 2010	Pessac, Gironde		récolté Badoc Alain	souterraine aérienne
<i>Carex gracillima</i> Schwein. Laiche gracieuse	27 01 2011	JB Bordeaux	TAL20110119	récolté Alain Badoc	souterraine
<i>Carex grayi</i> J.Carey Laiche massue, Laiche de Gray	27 01 2011	JB Bordeaux	TAL20110120	récolté Alain Badoc	souterraine
<i>Carex hirta</i> L. Laiche hérissée	11 06 2010	Pessac, Gironde		récolté Alain Badoc campus universitaire de Pessac	souterraine feuilles tiges

<i>Carex morrowii</i> Bott 'Ice Dance' Laiche japonaise 'Ice Dance'	16 02 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110211G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann	souterraine feuilles
<i>Carex muskingumensis</i> Schwein. Laiche palmier	15 07 2013	JB Talence	TAL20110343	ex Goethe Universität Frankfurt am Main IS 2011 XX-0-FRT-0000/689	souterraine
<i>Carex oshimensis</i> Nakai 'Everest' Laiche d'Oshima 'Everest'	16 02 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110208G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann Cascade www.xtr.nl EU 20080470 ©floramedia CASCAO53	souterraine feuilles
<i>Carex oshimensis</i> Nakai 'Evergold' Laiche d'Oshima 'Evergold'	17 02 2011	commerce	XX-0-TAL- 20110209G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann CERDYS 26627 production française	souterraine feuilles
<i>Carex pendula</i> Huds. Laiche pendante	03 2010 07 2010	Talence, Gironde	FR-0-TAL- 20100704W	bois de Thouars, récolté Alain Badoc	souterraine akènes
<i>Carex pseudocyperus</i> L. Laiche faux-souchet	07 2010	JB Talence	FR-0-TAL- 20070518W	ex bois de Thouars, Talence, Gironde, récolté 05 2007 Alain Badoc	akènes
<i>Carex riparia</i> Curtis Laiche des rives	27 01 2010	JB Bordeaux	TAL20110122	récolté Alain Badoc	souterraine
<i>Carex rafflesiana</i> Boott Laiche de Raffles <i>Carex rafflesiana</i> Boott	16 07 2013 01 et 03 2014	JB Talence JB Nantes	TAL20110326	ex JB Nantes IS 2011/452 ' <i>Carex virgata</i> Miq.'	souterraine akènes akènes
<i>Carex sparganioides</i> Mühlenb. Laiche faux-rubanier	16 07 2013	JB Talence	TAL20120348	ex JB Göttingen IS 2012/340 États-Unis, Caroline du Nord	souterraine
<i>Carex strigosa</i> Huds. Laiche maigre	21 11 2013	JB Talence	TAL20110220	JB Bonn IS 2011 DE-0-BONN-16288, Allemagne, Nordrhein-Westfalen, Wahner Heide, au nord de la caserne, 50°52.414'N, 7°09.848'W, récolté K. Finkel, A. Krämer, W. Lobin 19 05 1999	souterraine feuilles
<i>Carex tomentosa</i> L. Laiche tomenteuse	21 11 2013	JB Talence	FR-0-TAL- 20130508W	ex Talence, Gironde, Haut Carré, pré non fauché, récolté Alain Badoc 14 05 2013	souterraine

<i>Carex trifida</i> Cav. 'Rekohu Sunrise' Laiche trifide 'Rekohu Sunrise'	16 02 2011? ou 19 12 2013?	commerce	XX-0-TAL-20110212G	achat 13 02 2011 Pépinières Le Lann	souterraine feuilles
<i>Carex viridula</i> Michx. subsp. <i>oedocarpa</i> (Andersson) B.Schmid	20 09 2010	JB Talence	TAL20090302	ex JB Caen IS 2008-2009/570 B ' <i>Carex demissa</i> ' récolté 11 10 2007 Baupte, marais de Gorges, tourbière	souterraines feuilles
<i>Cyperus alternifolius</i> L. Papyrus à feuilles alternes	11 01 2010	JB Talence	XX-0-TAL-19991009G	recensement	souterraine tiges gainés
<i>Cyperus alternifolius</i> L. 'Zumula' Herbe à chat	11 01 2010	JB Talence	XX-0-TAL-20070101G	achat Jardinerie Delbard, 16 quai de la Mégisserie, 75001 Paris, www.takeawaytrends.com, S 50 117983	souterraine feuilles basales gainés brunes
<i>Cyperus diffusus</i> Vahl Papyrus nain	11 01 2010	JB Talence	XX-0-TAL-19980917G	ex Pépinières Le Lann achat Odile Ferrer	souterraine feuilles tiges
<i>Cyperus eragrostis</i> Lam. Souchet vigoureux	2010	JB Talence	FR-0-TAL-20070521W	ex Thouars, Talence, Gironde, récolté Alain Badoc	akènes
<i>Cyperus flavescens</i> L. Souchet jaunâtre	16 09 2010	Lac de Cazaux	FR-0-TAL-20100914W	récolté Alain Badoc	souterraine tiges
<i>Cyperus papyrus</i> L. Papyrus d'Égypte	11 01 2010	JB Talence	XX-0-TAL-19980906G	ex Pépinières de la Bamboueraie Prafrance	souterraine
<i>Cyperus</i> sp.	27 01 2010	JB Bordeaux	TAL20110123	récolté Alain Badoc ' <i>Juncellus serotinus</i> (Rottb.) C.B.Clarke', mais n'est pas <i>Cyperus serotinus</i> car on a 3 styles	souterraine
<i>Eleocharis bonariensis</i> Nees Scirpe de Buenos Aires	25 09 2010	JB Bordeaux	TAL20100925	récolté Alain Badoc	souterraine tiges gainés

<i>Schoenoplectus lacustris</i> (L.) Palla Jonc des chaisiers	17 09 2010	JB Bordeaux	TAL20100924	récolté Alain Badoc	souterraine gainés
<i>Schoenoplectus mucronatus</i> (L.) Palla Scirpe mucroné	25 09 2010 17 09 2010	JB Bordeaux	TAL20100917	récolté Alain Badoc récolté Alain Badoc	souterraine fructifi- cation non mûre !

## **2. Techniques**

### **2.1. Etudes analytiques**

#### **2.1.1. Extraction**

Dans la première partie de ce travail on a travaillé avec des petites quantités de matériel végétal (500 mg) afin d'analyser et identifier les principaux stilbènes présents dans les différentes parties des plantes.

Nous sommes partis de matériel frais (ou décongelé). 500 mg de matière fraîche de chaque échantillon ont été pesés et découpés aux ciseaux en petits morceaux. L'échantillon est disposé dans un mortier dans lequel sont ajoutés en plusieurs étapes, et tout en broyant avec le pilon, 6 x 2 mL de MeOH à température ambiante. L'extrait méthanolique est récupéré à l'aide d'une micropipette et le matériel végétal à l'aide d'une spatule. Le tout est placé dans un tube en pyrex bouché afin de poursuivre l'extraction.

#### **2.1.2. Agitation**

Les échantillons, correctement identifiés, sont placés sur un agitateur électrique Labquake (type "rotissoire") que l'on fait tourner à l'obscurité 15 à 24 heures (h) en chambre froide (4°C). Ce brassage du matériel végétal dans le méthanol permet d'extraire encore mieux les composés des échantillons.

#### **2.1.3. Centrifugation**

Une fois l'agitation terminée, on effectue une centrifugation des échantillons. (Centrifugeuse Sigma Bioblock Scientific 3K18-rotor 11133), après équilibrage des tubes, pendant 5 min à 3000 rotations par min. Il se forme un culot constitué de débris végétaux broyés et un surnageant diversement coloré.

#### **2.1.4. Séparation et récupération des phases liquides**

Le surnageant est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur et d'une propipette, et est transféré dans un autre tube en verre. Chaque tube est ensuite fermé par un bouchon et stocké à l'obscurité en chambre froide (4°C). Le culot subit une deuxième extraction méthanolique puis les deux surnageants sont regroupés puis évaporés.

#### **2.1.5. Colonnes SPE**

Les deux surnageants regroupés pour chaque échantillon sont concentrés d'abord à l'évaporateur rotatif sous vide puis évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur centrifuge sous vide (SpeedVac).

Les extraits secs obtenus sont re-solubilisés dans 300 µL de méthanol, complétés avec 700 µL d'eau distillée, avec passage au vortex puis aux ultrasons pour favoriser la redissolution et le dégazage.

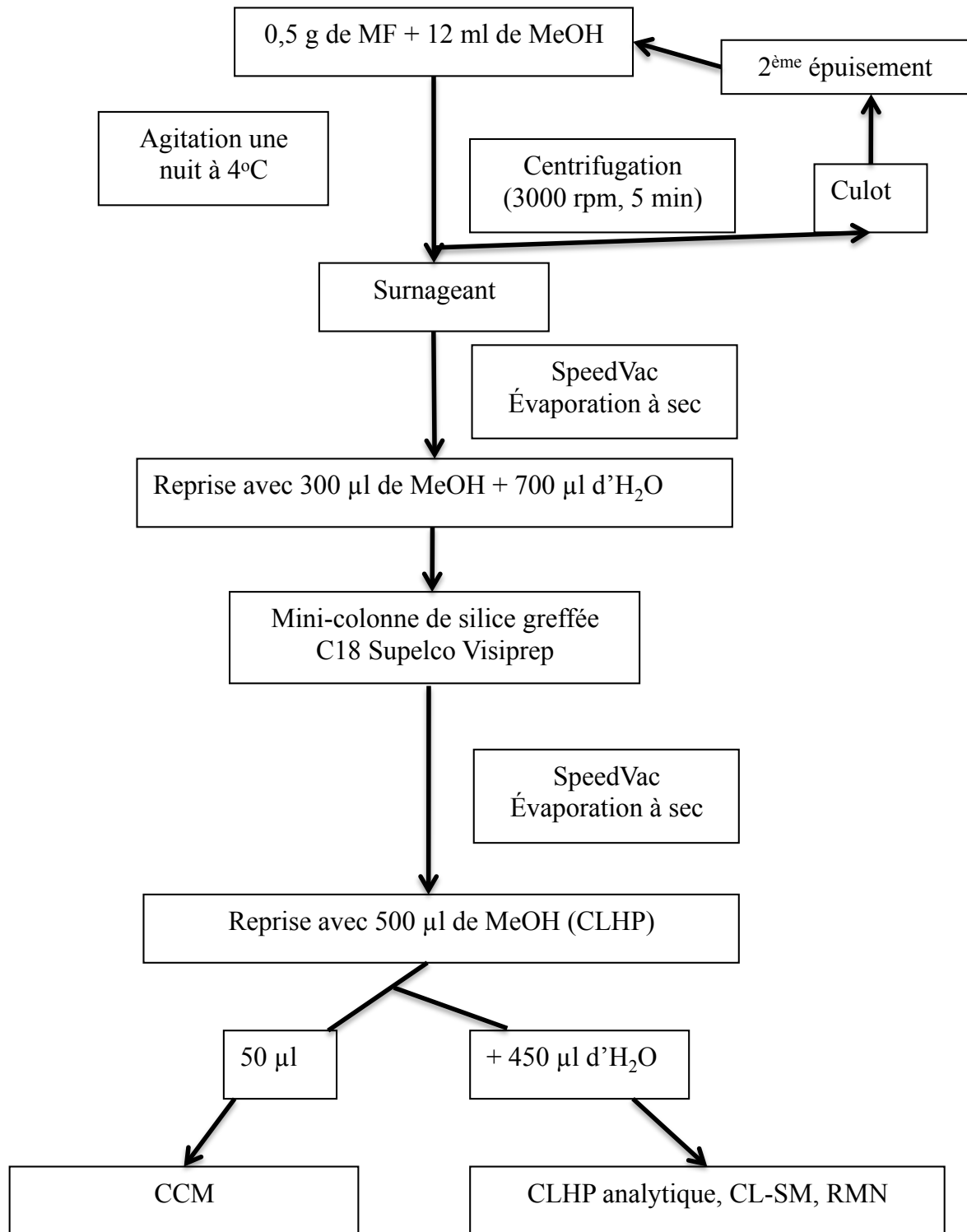
Les extraits ont été pré-purifiés sur des mini-colonnes SPE CL-18 de 3 mL Supelclean (**Figure 26**). Elles doivent d'abord être conditionnées : on dispose les mini-colonnes sur les embouts à vide de l'appareil et en dessous, dans la cuve à vide, on place des tubes "poubelles". Sous un vide réduit et sans mettre à sec chaque colonne on fait passer 2 mL de MeOH 100 %, 2 mL de MeOH 50 % et trois fois 2 mL d'eau distillée.

On verse alors les échantillons sur les minicolonnes. On lave par 2 mL d'eau et on sèche par le vide jusqu'à ce qu'il n'y ait plus aucune goutte d'eau qui ne sorte. On remplace alors les tubes "poubelles" par les tubes de récupération en verre de 7,5 cm de haut. On élue avec deux fois 2 mL de MeOH 90 %. Les solutions récupérées renferment essentiellement des polyphénols (flavonoïdes et stilbènes). Elles sont évaporées à sec au SpeedVac. Les extraits secs sont conservés en chambre froide à 4°C avant d'être étudiés par CCM ou CLHP (**Figure 27**).



**Figure 26.** Appareillage permettant de suivre 12 minicolonnes Supelclean SPE.





**Figure 27.** Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour le screening analytique des différents organes de diverses Cypéracées

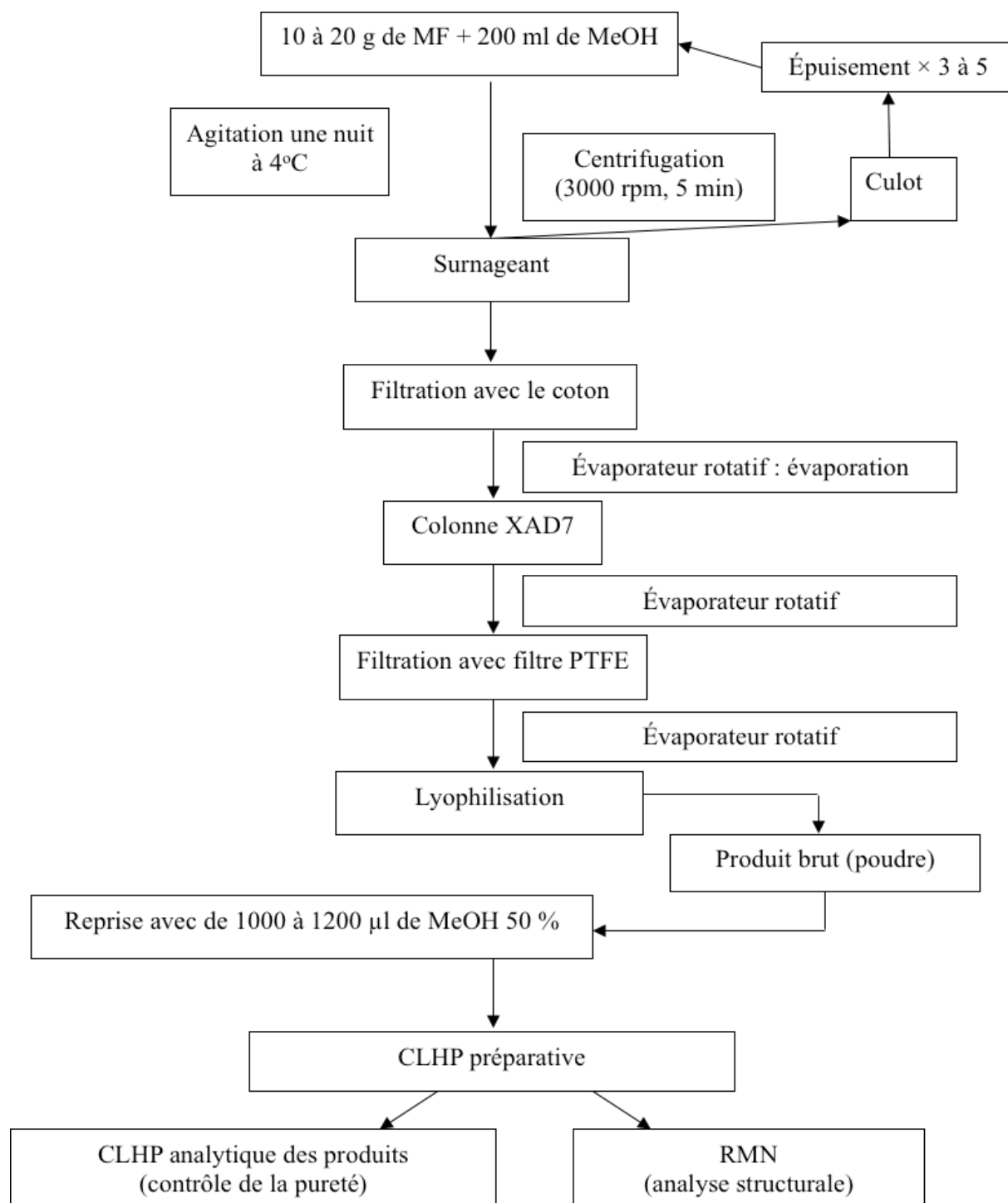
## **2.2. Etude préparative**

### **2.2.1. Parties souterraines (rhizomes)**

Pour obtenir des molécules pures (quelques mg), il faut partir d'une grande quantité de matériel végétal. Les minicolonnes SPE utilisées lors des pré-purifications pour les analyses analytiques ne suffisent plus. Ces protocoles de pré-purification doivent s'apparenter à une approche industrielle. 20 g de matière végétale sont extraits et broyés avec 200 mL de MeOH puis évaporés à un volume réduit. Les extraits ont été déposés sur des colonnes de résine XAD7 (diam. 4cm x 40cm). Les colonnes sont d'abord lavées avec de l'eau distillée (3 L) pour se débarrasser des composés non polyphénoliques (sucres...). Puis l'extrait est élué par du MeOH (3 L). Les extraits récupérés sont concentrés à l'évaporateur rotatif sous vide puis lyophilisés (**Figure 28**).

### **2.2.2. Parties aériennes (tiges, feuilles et akènes)**

Les parties aériennes étant riches en chlorophylles, nous avons fait une pré-purification basée sur une séparation liquide/liquide. 20 g de tiges ou feuilles fraîches ont été d'abord broyées avec du MeOH (200 mL) dans un mortier avec un pilon puis transférées en fiole d'Erlenmeyer. Après une agitation de 24 h à 4°C et à l'obscurité, les surnageants sont récupérés après centrifugation à 3000 rpm pendant 5 mn. Puis les extraits sont d'abord concentrés un par un à l'évaporateur rotatif sous vide puis évaporés à sec au SpeedVac. On ajoute à chaque extrait sec 200 mL de chloroforme plus 200 mL de H<sub>2</sub>O, on agite en passant au vortex, puis on centrifuge à 3000 rpm pendant 5 mn, on récupère la phase aqueuse et la phase organique. On ajoute de nouveau 200 mL de chloroforme à la phase aqueuse et on centrifuge une deuxième fois. On évapore à sec au SpeedVac la phase aqueuse, débarrassée des chlorophylles, qui contiennent les stilbènes. On ajoute de MeOH à chaque extrait sec pour les études analytiques par CCM et CLHP.



**Figure 28.** Schéma récapitulatif de la méthode d'extraction préparative.

### 2.3. Chromatographie sur Couche Mince : CCM

Une première estimation de la richesse en stilbènes des extraits peut se faire par CCM après passage sur les minicolonnes SPE.

On utilise des plaques en plastique recouvertes de gel de silice (0,20 mm de silice G60) avec indicateur de fluorescence UV 254 nm (Macherey-Nagel Polygram® Sil G / UV<sub>254</sub>) avec une migration sur 8 cm. On dépose à 1 cm du bord inférieur 5 à 50 µL de chaque échantillon et 5 µL de solutions témoin à 1 µg.µL<sup>-1</sup> d'(*E*)-resvératrol et d'(*E*)-picéide.

Deux mélanges de migration ont été utilisés. Les mélanges classiquement utilisés pour la migration des stilbènes sont composés de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) et de MeOH en quantité variable. L'ajout d'acide acétique (CH<sub>3</sub>COOH ou AcOH) favorise la migration des stilbènes.:

- CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH – 85/15/3 (V/V/V), qui permet une bonne séparation des monostilbènes.
- CHCl<sub>3</sub>/MeOH/AcOH – 70/30/3 (V/V/V), qui permet une meilleure visualisation des stilbènes glycosylés.

Les solvants vont monter par capillarité dans la plaque de silice et entraîner les produits contenus dans les échantillons selon leur affinité. La plaque est sortie quand le solvant arrive à environ 0,5 cm du bord supérieur et on laisse les solvants s'évaporer sous une sorbonne pendant quelques min (on peut accélérer l'évaporation à l'aide d'un sèche-cheveux).

La plaque est observée et photographiée dans le visible, à 366 et 254 nm en chambre noire, puis après pulvérisation sous sorbonne avec une solution d'anisaldéhyde sulfurique (anisaldéhyde/éthanol/acide sulfurique 5/90/5 (V/V/V)) ou de vanilline sulfurique (vanilline/éthanol/acide sulfurique concentré : 3 g/100 ml/3 ml) suivie d'un chauffage avec un décapeur thermique. La vanilline sulfurique donne des taches plus colorées et a finalement été retenue dans la plupart de nos études.

## **2.4. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance : CLHP**

Il s'agit de la séparation la plus fine des composants, pouvant permettre, en plus de l'analyse qualitative, une analyse quantitative.

La CLHP en phase inverse permet de séparer les composés en fonction de leur polarité. La phase stationnaire est dite inverse car elle est constituée de silice greffée par des chaînes alkyl (C18), ce qui lui confère un caractère apolaire. Les séparations sont réalisées selon un gradient de solvants composé d'un mélange d'acétonitrile (ACN) et d'eau acidifiée. Dans ces conditions, l'élution des composés phénoliques s'effectue des plus polaires aux moins polaires, entraînés par une phase mobile de plus en plus apolaire.

Pour l'ensemble de nos études, nous avons utilisé comme phase stationnaire une colonne C18 phase inverse et comme phase mobile un mélange de solvants en mode gradient : solvant A (H<sub>2</sub>O/TFA 0,1 %) et solvant B (ACN/TFA 0,1 %). Tout au long de la chromatographie, la concentration de l'acide trifluoroacétique reste constante et permet une bonne résolution des pics.

Le spectrophotomètre à barrettes de diodes (DAD) permet d'enregistrer les chromatogrammes à 286 et 306 nm ainsi que les spectres en continu de 200 à 600 nm. Les (*E*)-stilbènes absorbent plus à 306 nm et les (*Z*) à 286 nm.

Les échantillons récupérés après SPE sont à nouveau évaporés au maximum, puis repris dans 1 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (50/50) (V/V) qualité CLHP. Ils ont été filtrés à l'aide d'une seringue munie d'une cartouche de porosité 0,45 µm. Les filtrats sont ensuite placés dans des flacons pour passeur d'échantillons de 0,5 mL.

### **2.4.1. CLHP analytique**

La chromatographie est réalisée avec une chaîne CLHP 1100 Series Agilent Technologies constituée d'un système de purge, d'un corps de pompe (d'un débit maximum de 5 mL.min<sup>-1</sup>), d'un système d'injection automatique, d'un compartiment à colonnes thermostaté et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). La colonne utilisée est une Bischoff ProntoSil Eurobond phase inverse C18 (5 µm, 4 mm de diamètre × 250 mm) protégée par une pré-colonne C18. Le débit d'élution est de 1 mL.min<sup>-1</sup>.

Pour chaque échantillon, on a fait une injection de 20  $\mu\text{l}$ , avec enregistrement des chromatogrammes et de spectres (200-600 nm).

À partir d'une méthode déjà utilisée au laboratoire, le gradient a été allongé, le nombre de composés contenus dans les extraits n'étant pas connu, ni leur éventuelle proximité sur les chromatogrammes.

**Tableau 4.** Gradient du solvant B pour la CLHP analytique de diverses parties de Cypéracées.

Temps (min)	Solvant B (%)
0	10
5	10
35	60
40	60
42	100
45	100
49	10
59	10
60	10

#### 2.4.2. CLHP semi-préparative

La purification a été effectuée avec une chaîne CLHP Varian constituée de deux pompes (modèle 210 avec des têtes de 25  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de débit maximum) et d'un détecteur à double longueur d'onde UV-visible (modèle 345). Les solvants et le gradient sont les mêmes que dans les conditions analytiques (**Tableau 4**). Le débit passe à 3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  avec une colonne C18 phase inverse Bischoff ProntoSil Eurobond (5  $\mu\text{m}$ , 8 mm de diamètre x 250 mm) protégée par une pré-colonne C18. Les injections ont été de 0,1 à 0,8 mL pour des solutions d'environ 10 mg dissouts d'extrait sec dans 1 mL de MeOH 50 %. On a récupéré les principaux pics repérés en CLHP analytique.

### 2.4.3. CLHP préparative

Afin d'augmenter notre capacité de production de composés purs, nous avons utilisé une chaîne CLHP préparative Varian constituée de deux pompes (modèle 218 avec des têtes de 50 mL.min<sup>-1</sup> de débit maximum) et d'un détecteur à double longueur d'onde UV-visible (modèle 325). Le débit est cette fois-ci de 18 mL.min<sup>-1</sup> avec une Colonne C18 phase inverse Bischoff Ultrasep Eurobond (5 µm, 20 mm de diamètre x 250 mm) protégée par une colonne de garde C18 (20 mm de diamètre x 50 mm). Les solvants utilisés sont toujours les mêmes et le gradient est le même que celui décrit plus haut (**Tableau 4**). Les injections allaient de 0,1 à 2 mL pour des solutions d'environ 20 mg d'extrait sec dissouts dans 1 mL de MeOH 50 %. Le protocole d'extraction en grande quantité est représenté dans la **Figure 28**.

## 3. Spectrométrie de masse (SM)

Le spectromètre de masse utilisé pour les travaux de cette thèse est un spectromètre à source Electrospray et à trappe ionique (ESI-IT).

### 3.1. Principe

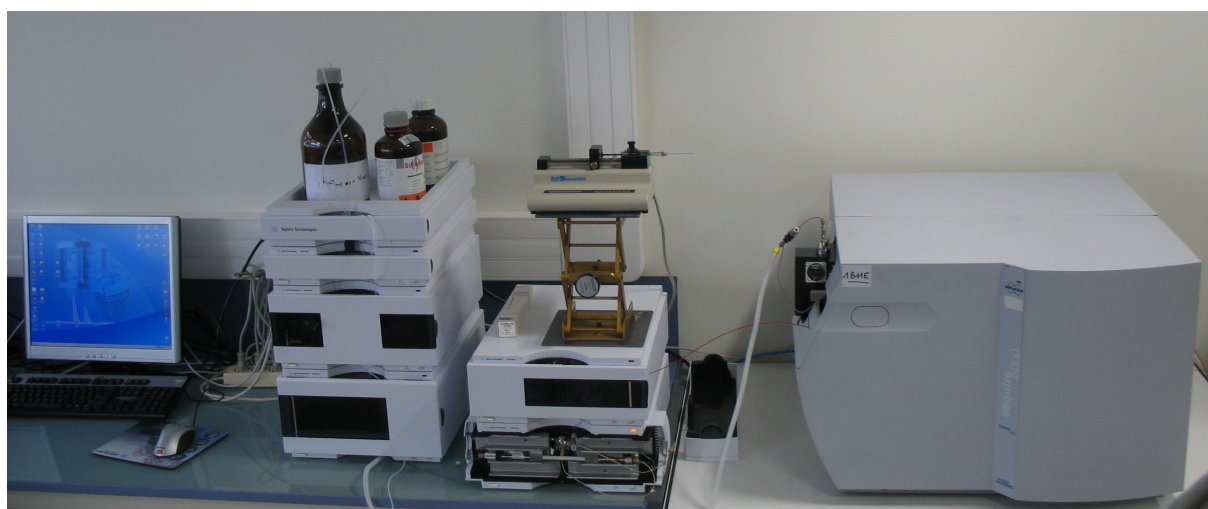
L'échantillon est introduit dans la source d'ionisation du spectromètre de masse au travers d'une « aiguille ». Sous l'effet d'un champ électrique, le liquide est vaporisé en un nuage de fines gouttelettes chargées (nébulisation). Le solvant de ces dernières est progressivement évaporé sous l'effet de l'azote chauffé. Au fur et à mesure de l'évaporation du solvant, la taille des gouttelettes diminue jusqu'à ce que la limite de Rayleigh soit atteinte. Les répulsions électrostatiques sont alors telles que cela engendre une explosion coulombienne de ces gouttelettes. Le skimmer, les octopoles et les lentilles permettent ensuite de concentrer et de focaliser le faisceau d'ions jusqu'à la trappe d'ions. En SM simple, les ions sont ensuite éjectés de la trappe d'ions et analysés au niveau d'un détecteur.

La spectrométrie de masse en tandem (SM<sup>n</sup>) permet de piéger et de fragmenter un ion préalablement sélectionné par collision avec l'hélium dans la trappe d'ions. Ce mode permet d'obtenir des informations supplémentaires quant à la structure des composés.

### **3.2. Appareillage LC-Masse**

La séparation des composés phénoliques a été réalisée sur une chaîne CLHP 1200 Séries Agilent. Le détecteur à barrette de diodes permet l'obtention de spectres UV-Visible allant de 240 à 600 nm. Le spectromètre de masse à piège d'ions esquire 6000 Bruker Daltonics est équipé d'une source d'ionisation Electrospray (SIE).

Les échantillons injectés (20  $\mu$ L) sont séparés sur la même colonne analytique décrite plus haut (Bischoff ProntoSIL phase inverse C18 - 5  $\mu$ m, 4 mm de diamètre  $\times$  250 mm) protégée là encore par une pré-colonne C18. La température de la colonne est maintenue à 25°C. A la sortie du détecteur à barrette de diodes, seule une partie des effluents sont injectés dans le spectromètre de masse.



**Figure 29.** Chaîne LC-Masse utilisée.

### **3.3. Conditions d'analyse**

Les solvants et le gradient utilisés sont les mêmes que pour la CLHP analytique.

### **3.4. Paramètres SIE, SM et SM<sup>n</sup>**

Le diazote ( $N_2$ ) sert à pulvériser l'échantillon sous forme de gouttelettes et à les assécher afin d'obtenir les ions pseudomoléculaires. Les analyses sont réalisées en mode positif avec comme paramètres :



- ✓ tension du capillaire à -4,7 kV
- ✓ nébuliseur à 35 psi
- ✓ gaz sec 10 L.min<sup>-1</sup>
- ✓ température du capillaire fixée à 350°C.

L'hélium est utilisé comme gaz de stabilisation, de focalisation et de collision pour fragmenter les ions en SM<sup>n</sup>. Ces ions sont ensuite convertis en pics d'intensités différentes que l'on peut observer sur les chromatogrammes.

Les spectres de la CLHP-SM sont acquis en "Full Scan" sur l'ensemble de la gamme des masses ( $m/z$ ) allant de 150 à 2000. L'ensemble des données est ensuite collecté et traité par le logiciel Hystar version 3.0.

L'acquisition et le traitement des données sont réalisés par le logiciel Bruker Daltonics data analysis.

#### **4. Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique assez récente au regard des spectroscopies classiques. Elle constitue actuellement la technique la plus puissante et la plus générale d'analyse structurale des composés organiques.

Afin de finaliser la détermination de la structure moléculaire d'un composé, il est possible de passer celui-ci en RMN. Le principe de cette technique, ainsi que la lecture des spectrogrammes obtenus, sont très complexes.

On retiendra que l'on applique à la molécule une fréquence électromagnétique donnée spécifique à un noyau (H, C, N, P...) correspondant à sa fréquence d'excitation. Ceci va entraîner un changement énergétique des noyaux de même nature présents dans la molécule. Lors de leur retour à l'état d'équilibre, ces noyaux vont émettre une onde électromagnétique (ou fréquence de résonance) qui sera détectée par un capteur. Cette fréquence de résonance sera différente selon l'environnement chimique du noyau étudié.

Plaçons-nous en RMN protonique : l'hydrogène d'un groupement alcool (-OH) aura une fréquence de résonance supérieure à celle de l'hydrogène d'un groupement carboxyle (-COOH).

Il va de soi que plus la molécule étudiée est de poids moléculaire élevé, plus le spectre obtenu est complexe, et plus la détermination de la structure moléculaire est difficile. La détermination des molécules demande énormément de travail, ne serait-ce que pour former son œil à l'analyse des spectrogrammes. Les composés purifiés par chromatographie préparative ont été analysés sur un spectromètre Bruker 600 MHz équipé d'une sonde TXI. Au moins 1 mg de poudre du composé, supposé pur, est nécessaire pour l'analyse.



**Figure 30.** Spectromètre RMN.

Les spectres ont été acquis à température ambiante. Les solvants utilisés sont le méthanol deutéré et l'acétone deutéré et les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS. Pour chaque spectre, environ 1 mg de composés purs sont dilués dans 1 mL de solvant. Des tubes de 5 mm de diamètre sont utilisés.

Les spectres 1D acquis sont les spectres  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

Les spectres HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) permettent de définir les protons distants de deux ou trois liaisons d'un carbone donné.

Les spectres HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation) permettent de définir les protons qui sont distants d'une liaison d'un carbone donné.

Les spectres  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Correlated Spectroscopy) permettent de définir les protons vicinaux et géminaux.

Les spectres NOeSY (Nuclear Overhauser effect Spectroscopy) permettent de déterminer si les protons sont proches dans l'espace.

#### **4.1. CL-RMN (Agilent 1200/Bruker 600Hz)**

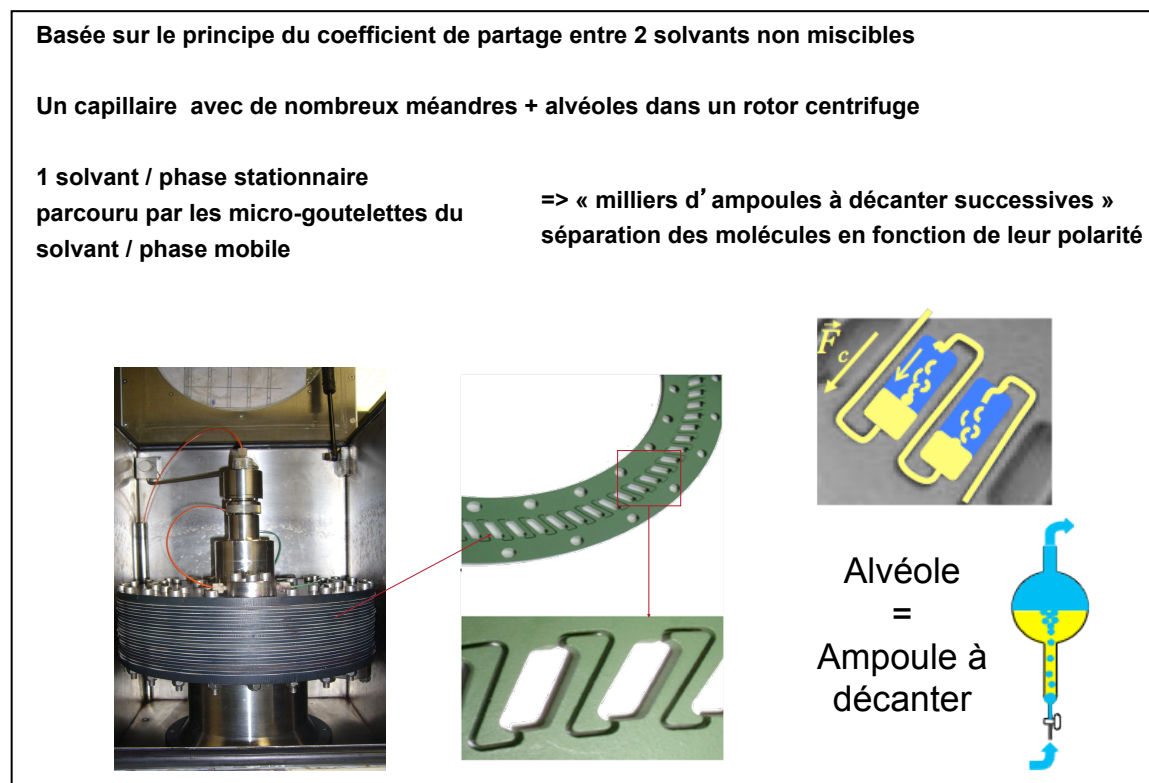
Cette technique permet d'identifier directement les molécules présentes dans l'extrait, sans purification préalable longue et obtention d'une poudre pure. Les composés sont séparés par chromatographie liquide et sont ensuite directement injectés dans la sonde RMN. Cette technique permet de travailler sur un extrait entier et avec une petite quantité de matière.

Une chaîne CLHP (Agilent 1200) est couplée au spectromètre RMN. Le gradient utilisé pour la CLHP est le même que celui décrit plus haut pour l'analytique. Les pics importants sont récupérés et élués dans la sonde RMN avec de l'acétonitrile deutéré.

### **5. Chromatographie Partage Centrifuge : CPC**

La CPC est une méthode chromatographique préparative liquide-liquide sans support solide dont le principe est basé sur les différences de partage des solutés entre deux phases non miscibles. La phase stationnaire liquide est maintenue dans les cellules orientées radialement par une force appliquée par rotation autour d'un axe unique. Il existe deux modes de développement en CPC : mode élution et mode déplacement. En mode élution, mode que nous avons utilisé, la phase mobile est pompée à travers la phase stationnaire jusqu'à l'obtention d'un équilibre stable entre les volumes de la phase stationnaire et de la phase mobile. La séparation des solutés est réalisée par des phénomènes de partage. Les solutés émergent de l'appareil dans un volume de rétention donné par la relation  $V_r = V_m + K_d.V_s$ , avec  $K_d$  comme constante de distribution du soluté dans le système de solvants. La nature liquide de la phase stationnaire permet de choisir laquelle de la phase inférieure ou supérieure sera la phase stationnaire. Le mode de pompage de la phase mobile sera différent selon le

choix de la phase mobile. Si la phase mobile est plus légère, l'injection se fait dans le sens opposé à la force centrifuge, c'est-à-dire de la périphérique vers le centre ; c'est le mode ascendant. Dans le cas contraire, c'est le mode descendant (**Figure 31**).



**Figure 31.** Principe de la CPC.

### 5.1. Mise au point du système de solvants CPC

La qualité de la séparation en CPC dépend du choix des solvants utilisés ; la polarité des phases conditionne la distribution des molécules. Le système choisi doit être stable. Le choix du système de solvants est basé sur le partage du composé entre les deux phases du système choisi. Pour établir le bon système, nous avons utilisé la méthode dite "de l'ampoule à décanter" (Foucault et Chevolot, 1998 ; Berthod et Carda-Broch, 2004). Pour chaque système de solvants de la gamme "ARIZONA", 0,5 mg d'extrait est solubilisé dans 1 mL de phase supérieure et 1 mL de phase inférieure. Après agitation et reformation des deux phases, 500  $\mu$ L de chaque phase sont prélevés, évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur centrifuge sous vide (SpeedVac), repris dans 0,5 mL d'un mélange méthanol-eau (1 :1, v/v) puis

analysés par CCM et surtout par CLHP. Le coefficient de partage  $K_d$  est calculé par le rapport des aires sous le pic de soluté dans chaque phase.

Une fois le système de solvants choisi en fonction des  $K_d$  obtenus pour les molécules qui nous intéressent, on peut passer à la séparation dans l'appareil de CPC.

## **5.2. CPC 200 mL**

La CPC 200 mL utilisée est une FCP200r de la société Kromaton Technologies (Sainte-Gemmes-sur-Loire, France). La pompe utilisée est une Gilson 321-H1 haute-pression à deux voies permettant de réaliser des gradients. Les échantillons sont introduits grâce à une vanne d'injection Rheodyne 3725(i)038 équipée d'une boucle de 20 mL. La collecte est effectuée dans des tubes de 20 mL à l'aide d'un collecteur Gilson FC204. Les expériences ont été réalisées dans une pièce régulée à 23°C.

600 mL de phase stationnaire sont pompés à  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  dans le mode (ascendant ou descendant) correspondant à l'expérience afin de s'assurer de l'homogénéité du solvant dans la colonne et rincer d'éventuels composés restés à la suite des essais précédents. Dans certaines expériences, la colonne est mise en rotation à 300 rpm au bout de 300 mL. La phase d'équilibrage est réalisée à 1000 ou 1300 rpm selon les expériences avec un débit dépendant du système de solvant et de l'expérience réalisée. Les changements éventuels de solvants ont été réalisés en changeant la bouteille de solvant et en purgeant manuellement la voie. Les échantillons sont injectés dans un mélange de chacune des phases dans un volume le plus petit possible et filtrés sur filtre en téflon de  $0,45 \mu\text{m}$ . Le débit utilisé lors de la séparation/élution a été de  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  avec le solvant de la phase mobile. Le mode sandwich indiqué pour certaines expériences signifie que l'injection de l'échantillon est réalisée sans équilibrage préalable de la colonne. Le lavage est effectué par le reste de phase stationnaire non utilisé puis par 600 mL d'un mélange eau/acétone, eau/méthanol ou eau/éthanol à un débit de  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  sans rotation.

### 5.3. CPC 1 L

La CPC 1 L utilisée est une chaîne FCPC1000r de la société Kromaton Technologies (Sainte-Gemmes-sur-Loire, France). Les équipements annexes à la colonne, tels que la pompe et le détecteur UV sont fournis avec l'appareil. La collecte a été effectuée manuellement en flacons de 50 mL. La boucle d'un volume de 50 mL est remplie avec un volume toujours inférieur à 45 mL.

3 L de phase stationnaire sont pompés à  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  dans le mode correspondant à l'expérience avant chaque série de séparation. La colonne a toujours été mise en rotation à 1000 rpm. L'élution avec la phase mobile est réalisée avec un débit variable de  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  à  $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  en mode manuel.

Le volume de solvant pour le lavage de la colonne est de 3 L.

Le reste des paramètres est identique à ce qui a été décrit pour la CPC 200 mL.

## 6. Tests *in vitro*

### 6.1. Tests d'activité antioxydante (DPPH)

L'activité antiradicalaire des composés isolés à partir des plantes est évaluée en mesurant leur capacité de piéger le radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl) ; sa couleur violette foncée se transforme en jaune lors de sa réduction (captée par les produits testés).

#### 6.1.1. Préparation des produits

On prépare une solution de DPPH à 100 mM : on pèse 19,7 mg de DPPH (PM : 394,3) qui vont être dissouts dans 50 mL de méthanol. Puis une seconde dilution au 1/10 dans le méthanol est effectuée.

On prépare une solution mère de la molécule témoin (quercétol) à 50 mM dans le méthanol.

Pour les composés à tester, on prépare 4 concentrations différentes 1 ; 0,1 ; 0,01 et 0,001 mg.mL<sup>-1</sup> (dans le méthanol). La solution méthanolique de DPPH est préparée 4 h avant l'expérience est conservée à l'obscurité.

On utilise une microplaque 96 puits de 1 mL. Dans chaque puits on ajoute 50 µL de méthanol (blanc) ou d'échantillon ; 150 µL de DPPH. Chaque échantillon est testé en triplicata. On incube la plaque à 37°C pendant 30 min à l'obscurité puis on lance le protocole DPPH à 25°C et la mesure de l'absorbance à 520 nm (l'expérience dure 20 min). Les absorbances seront lues avec un spectrophotomètre pour microplaque à 96 puits.

### **6.1.2. Analyses**

Les résultats peuvent être exprimés en tant qu'activité antiradicalaire ou inhibition des radicaux libres en pourcentage en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100$$

A<sub>B</sub> : absorbance du blanc

A<sub>E</sub> : absorbance de l'échantillon à t = 20 minutes.

Le coefficient de variation entre les trois valeurs d'absorbance des échantillons ne doit pas être supérieur à 5 %.

### **6.2. Tests d'activité antioxydante (ORAC)**

La méthode ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique, l'AAPH, radical peroxy libre stable. Si le produit à tester est capable de protéger la fluorescéine et réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence, il possède alors un pouvoir antioxydant. La méthode est réalisée en microplaque dans laquelle est mesuré en parallèle le déclin de la fluorescéine au cours du temps en présence de concentrations croissantes de trolox (une molécule de référence, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) et des échantillons à tester à différentes concentrations. Le but est d'obtenir une réponse comparable à celle de la gamme. On peut ainsi, après traitement des données, calculer l'équivalent trolox. La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de la capacité se fait par l'intermédiaire du calcul des aires sous la courbe. C'est la seule méthode qui combine à la fois le pourcentage

d'inhibition de la réaction d'oxydation et la longueur dans le temps de cette inhibition en une seule mesure. Elle donne une mesure globale de la capacité antioxydante.

### 6.3. Test MCA (Metal Chelating Activity)

#### 6.3.1. Objectif

Cet essai permet de mesurer la capacité d'un composé ou d'un extrait à chélater le fer dans le milieu. La ferrozine, très bon chélateur de fer, forme un complexe de couleur rouge-violet en se chélatant avec le  $\text{Fe}^{2+}$ . La réaction est plus ou moins empêchée en présence d'autres agents chélateurs et cela entraîne une baisse de la coloration rouge des complexes ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$ . La mesure de la réduction de la couleur détermine l'activité chélatrice compétitrice de la ferrozine pour les ions ferreux (Soler-Rivas *et al.*, 2000). L'EDTA est utilisé comme étalon.

#### 6.3.2. Mode opératoire

Dans chaque puits d'une plaque 96 puits, on ajoute : 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeSO}_4$  à 0,2 mM ; 40  $\mu\text{L}$  de composé pur (à 4 concentrations différentes entre 2,5 et 25  $\mu\text{M}$ ), de méthanol (blanc) ou d'EDTA ; 80  $\mu\text{L}$  d'eau distillée et enfin 40  $\mu\text{L}$  de ferrozine (2 mM). Après incubation à 25°C pendant 10 min, une lecture spectrométrique est effectuée à 550 nm.

### 6.4. Test PC12

#### 6.4.1. La culture des cellules PC12

Nous utilisons comme modèle d'étude la lignée cellulaire PC12. Ces cellules sont des cellules souches issues de la médullo-surrénale de rat (**Figure 32**). Elles sont fournies par ATCC (Molsheim, France).

Composition et milieu de culture : toutes les manipulations se font en conditions stériles. Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 75  $\text{cm}^2$  coatés. Elles sont cultivées dans 81,5% de Dulbecco's Modified Eagle Medium Glutamax (DMEM). Ce milieu est complétementé de 2,5% de sérum de veau fœtal, 15% de sérum de cheval et 1% d'un



mélange d'antibiotiques. Le milieu obtenu est alors appelé milieu complet. Les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide à 5% de saturation en CO<sub>2</sub>.

Entretien des cellules PC12 : à 80% de confluence, les cellules sont rincées au phosphate buffered saline (PBS) (sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>). Elles sont ensuite mises en suspension dans 5 mL d'un mélange trypsine-EDTA (0,02-0,5 g.mL<sup>-1</sup>). Après 5 minutes d'incubation à 37°C, l'action de l'enzyme protéolytique est stoppée en ajoutant une solution de 5 mL de PBS (sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>). Après centrifugation les cellules sont récupérées puis ensemencées au 1/16<sup>ème</sup> dans 20 mL de milieu complet.

#### 6.4.2. Les conditions expérimentales

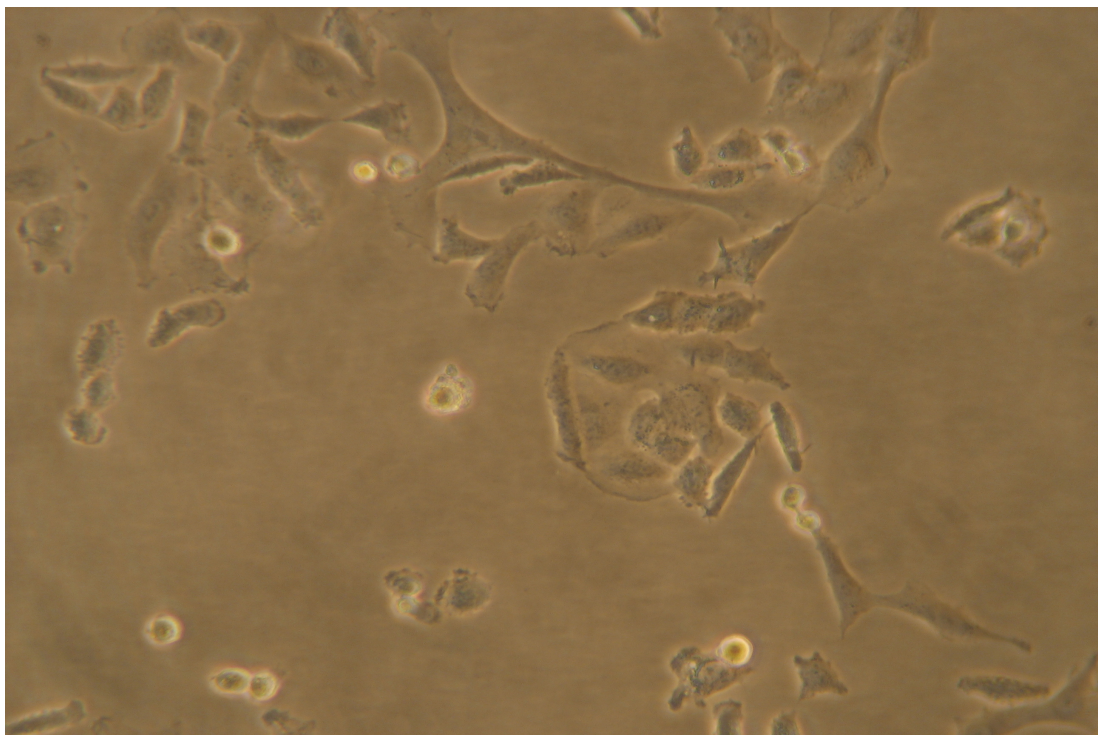
Pour le besoin des expériences, les cellules PC12 sont ensemencées dans des plaques de 6 ou 96 puits à raison de 20.10<sup>3</sup> ou 1.10<sup>6</sup> cellules par puits, respectivement. Après 24 heures, les cellules sont mises en présence des polyphénols testés et du peptide  $\beta$ amyloïde  $\beta$ A. Le temps de traitement, ainsi que les concentrations de ces différents composés seront définis au fur et à mesure de nos expériences. Le  $\beta$ A utilisé sera le peptide  $\beta$ A<sub>25-35</sub> contenant la séquence 25-35, séquence minimale nécessaire pour induire la mort cellulaire *in vitro* (Yankner *et al.*, 1989).

#### 6.4.3. Test de viabilité cellulaire

Le principe est basé sur la réduction du 3-(4,5-diméthylethiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolum bromide (MTT) par une succinate déshydrogénase au niveau de la mitochondrie de la cellule. Seules les cellules vivantes qui sont métaboliquement actives pourront transformer le MTT hydrosoluble de couleur jaune, en des cristaux de formazan, insolubles et violets. Les cristaux sont ensuite dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). L'absorbance des échantillons, obtenue par une lecture spectrophotométrique, sera proportionnelle à la concentration de cellules vivantes dans l'échantillon.

Après traitement, les cellules sont lavées au PBS avant d'être mises en contact avec une solution de MTT (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) à raison de 200  $\mu$ L par puits (plaque 96 puits). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 3 heures. La solution de MTT est alors

remplacée par 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, à l'abri de la lumière et à température ambiante, pendant 30 minutes. Puis, une lecture spectrométrique est effectuée à 595 nm.

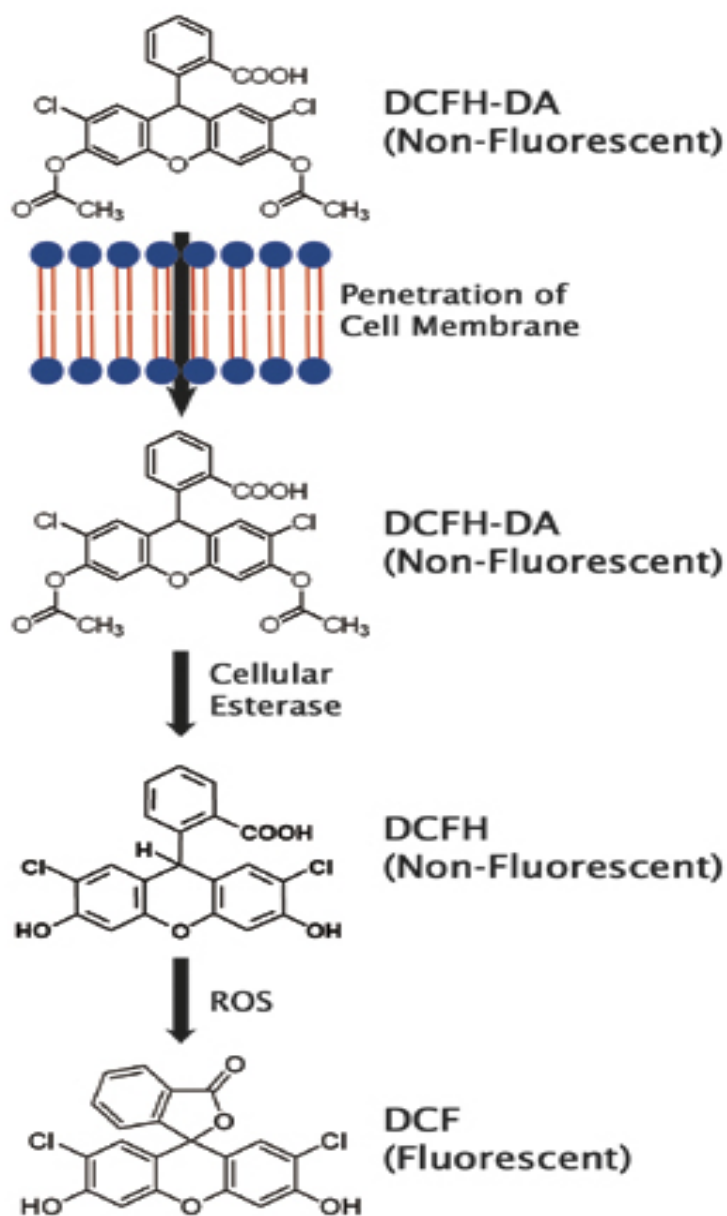


**Figure 32** : Lignée cellulaire PC12

#### **6.4.4. Dosage des espèces réactives de l'oxygène**

Le dosage des ROS est réalisé en utilisant le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (DCFH<sub>2</sub>-DA). Ce composé pénètre dans la cellule où il va subir une déacétylation par une estérase, pour donner le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH<sub>2</sub>). Les ROS présents dans la cellule vont alors oxyder ce dernier, le transformant en 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) qui fluoresce. La fluorescence, lue au spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité de ROS contenus dans la cellule (**Figure 33**).

Après traitement, les cellules neuronales sont incubées en présence de 10  $\mu\text{M}$  de DCFH<sub>2</sub>-DA dans du PBS, 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Après quatre lavages au PBS, la mesure de la fluorescence est réalisée aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission, 485 et 550 nm, respectivement.



**Figure 33.** Principe du test DCFH<sub>2</sub>-DA. (*in* <http://www.cellbiolabs.com/reactive-oxygen-species-ros-assay>)

## Résultats et discussions

Pendant toute la durée de mon travail de thèse, j'ai étudié de nombreuses plantes de la famille des Cypéracées et plus particulièrement celles du genres *Carex* et *Cyperus*.

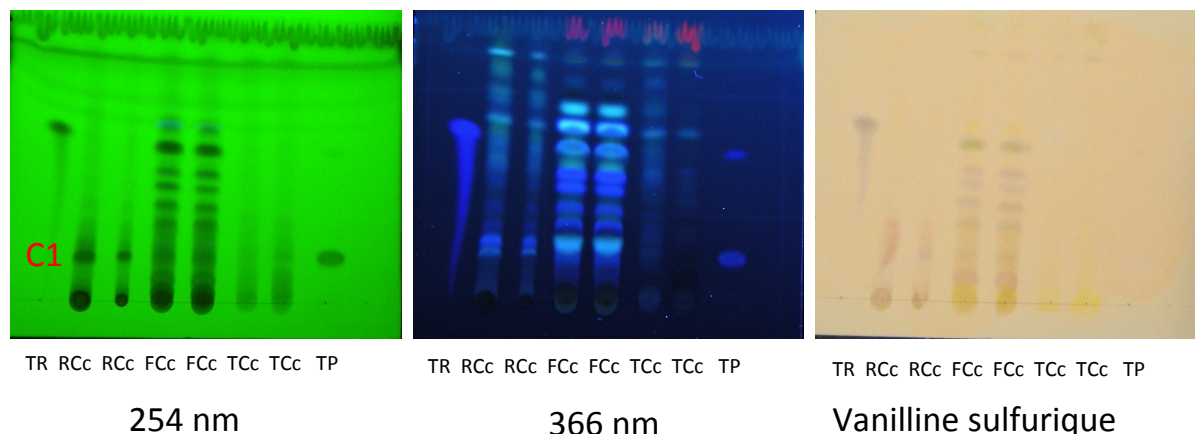
Les premiers mois de ma thèse ont été consacrés à mettre au point et adapter des méthodes d'extraction et de pré-purification à partir des premières plantes que le Dr Alain Badoc pouvait nous procurer.

Concernant les méthodes d'extraction, nous avons repris des techniques employées classiquement en phytochimie telles que le broyage au mortier en présence d'un solvant d'extraction (le méthanol dans notre étude) et d'une série successive d'épuisements par ce solvant par macérations, agitations (cf partie Matériels et Méthodes).

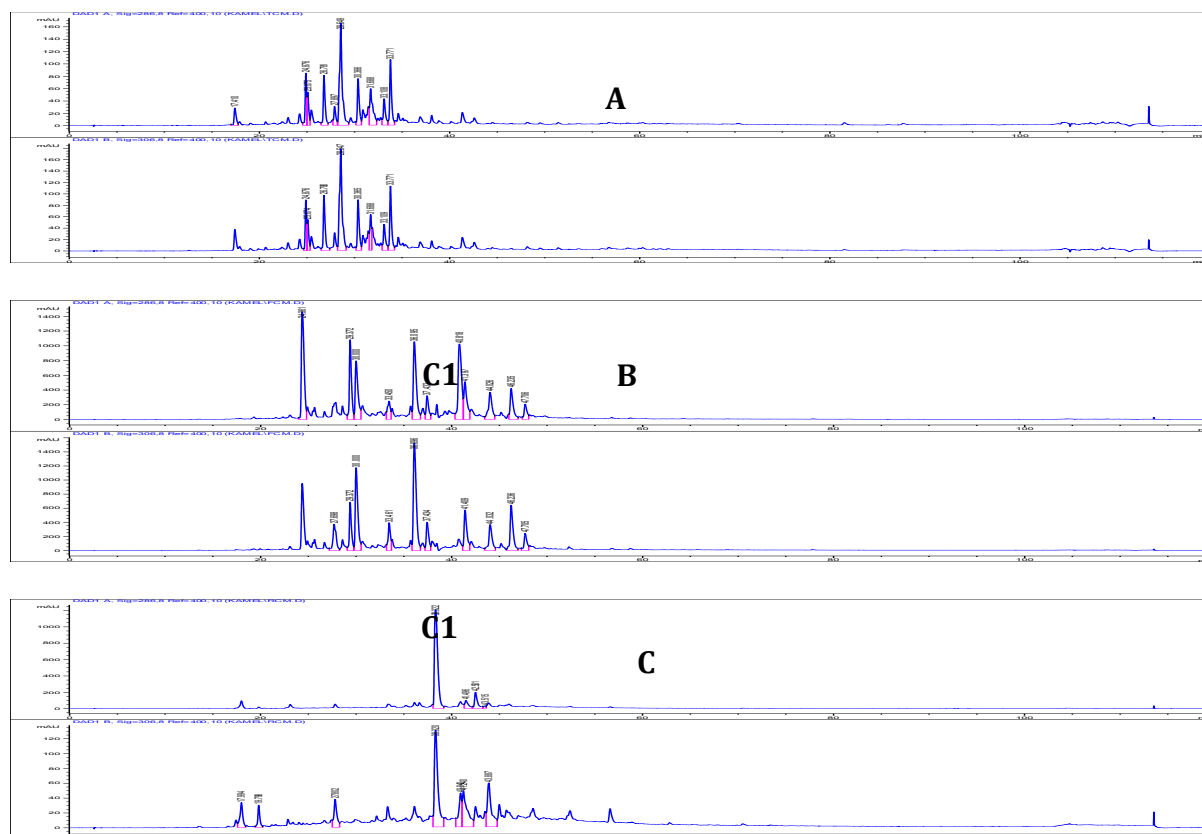
Les extraits bruts après concentration à l'évaporateur rotatif sous vide puis à l'évaporateur centrifuge sous vide (de type SpeedVac) ont ensuite été prépurifiés par une technique SPE sur mini-colonnes C18, adaptée d'une méthode utilisée en routine au laboratoire. Pour tous nos extraits prépurifiés que nous avons eu à analyser, nous avons toujours utilisé notre même méthode standard avec toujours des quantités de matière fraîche (ou sèche pour des graines) identiques afin de pouvoir comparer les richesses en stilbènes de nos plantes entre elles.

Sur les premières plantes que nous avons analysées, nous avons très vite remarqué que les chromatogrammes CLHP des extraits de parties souterraines donnaient des signaux très forts et des profils très intéressants avec des pics séparés suffisamment pour nous permettre d'espérer pouvoir les isoler par la suite par CLHP préparative en quantités conséquentes. A l'inverse, à notre grande déception, les chromatogrammes CLHP-DAD analytique des extraits de parties aériennes étaient très complexes avec une "forêt de pics" très serrés, un signal global très faible et souvent une ligne de base assez haute. Nous avons donc préféré laisser de côté ces parties aériennes qui nous ont semblé peu propice à l'obtention rapide et aisée de grandes quantités de stilbènes.

Je donne dans les figures 34 et 35 suivantes des exemples de chromatogrammes CCM et CLHP d'extraits de parties souterraines et aériennes d'un *Carex* (*Carex cuprina*) où le composé C1 est un stilbénoloïde qui nous intéresse. Il est en beaucoup plus grande quantité et semble plus facile à être séparé dans les parties racinaires.



**Figure 34.** Comparaison par CCM des profils des parties souterraines et parties aériennes de *Carex cuprina*. TR : Témoin (*E*)-resvératrol ; RCc : racine de *C. cuprina* ; FCc : feuille de *C. cuprina* ; TCc : tige de *Carex cuprina* ; TP : témoin de (*E*)-piceid



**Figure 35.** Chromatogrammes CLHP des différentes parties de *Carex cuprina* à 286 (haut) et 306 (bas) nm. A : tige, B : feuille, C : racine , C1 : stilbène recherché.

J'ai utilisé le mot "déception" juste au-dessus car, en effet, dans l'optique d'une production de stilbènes en grandes quantités, l'utilisation des parties aériennes en les coupant sur la plante aurait été beaucoup plus simple que de devoir arracher la plante pour utiliser ses racines.

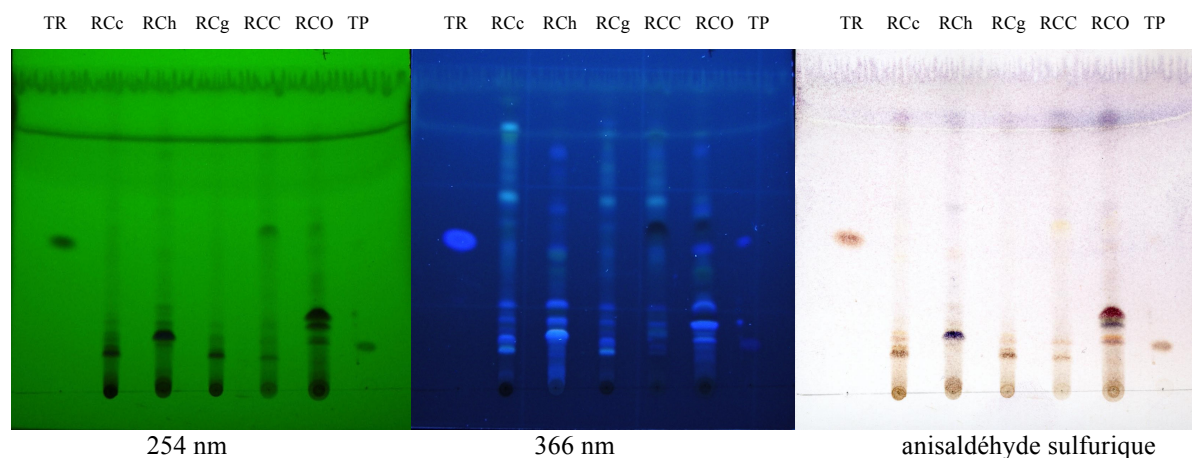
Dans le prochain chapitre, je vais présenter mes travaux concernant les plantes qui m'ont permis d'obtenir les plus importants résultats et qui m'ont permis de réaliser ma première publication sur la thématique de ma thèse.

# Chapitre 1. Etude des stilbénoides chez quelques Cypéracées : *Carex hirta*, *C. cuprina*, *C. glauca*, *C. oshimensis*, *C. capillacea*, *C. buchananii*.

## 1. Etude chromatographique, analytique et préparative

### 1.1. CCM

Un premier screening par CCM (**Figure 36**) a mis en évidence, sous UV ou après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique ou vanilline, des spots plus ou moins nombreux de couleur et de Rf différents selon les échantillons. Certaines parties de ces espèces pourraient être plus riches que d'autres en stilbènes. La présence potentielle de stilbènes est en effet envisagée quand à la fois des taches bleues fluorescentes à 366 nm et des taches bleues violettes après pulvérisation à l'anisaldéhyde sulfurique ou vanilline apparaissent.



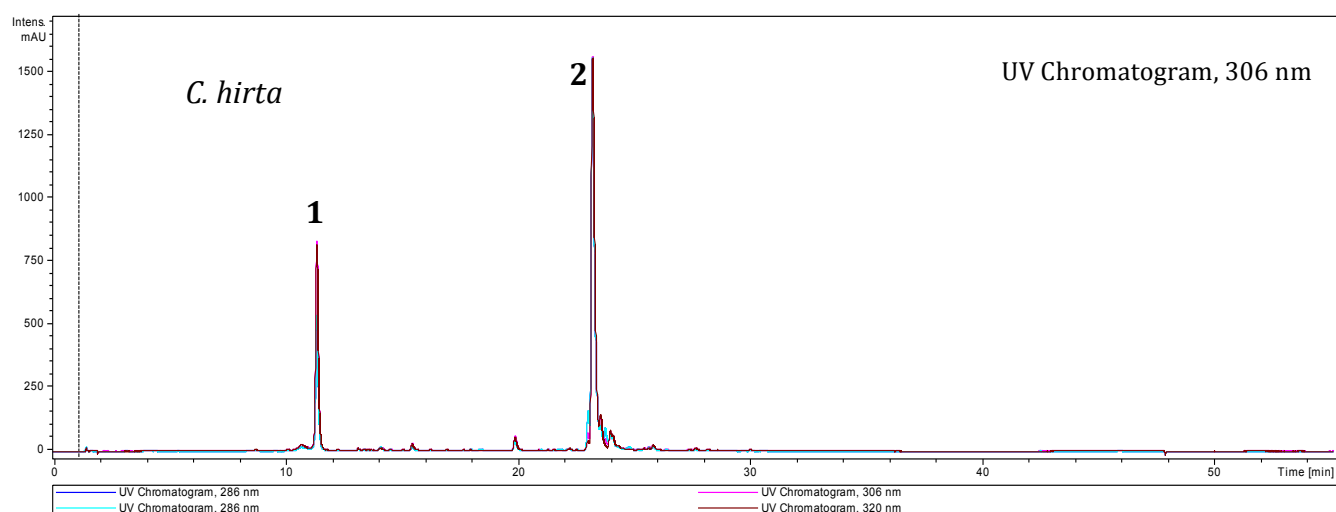
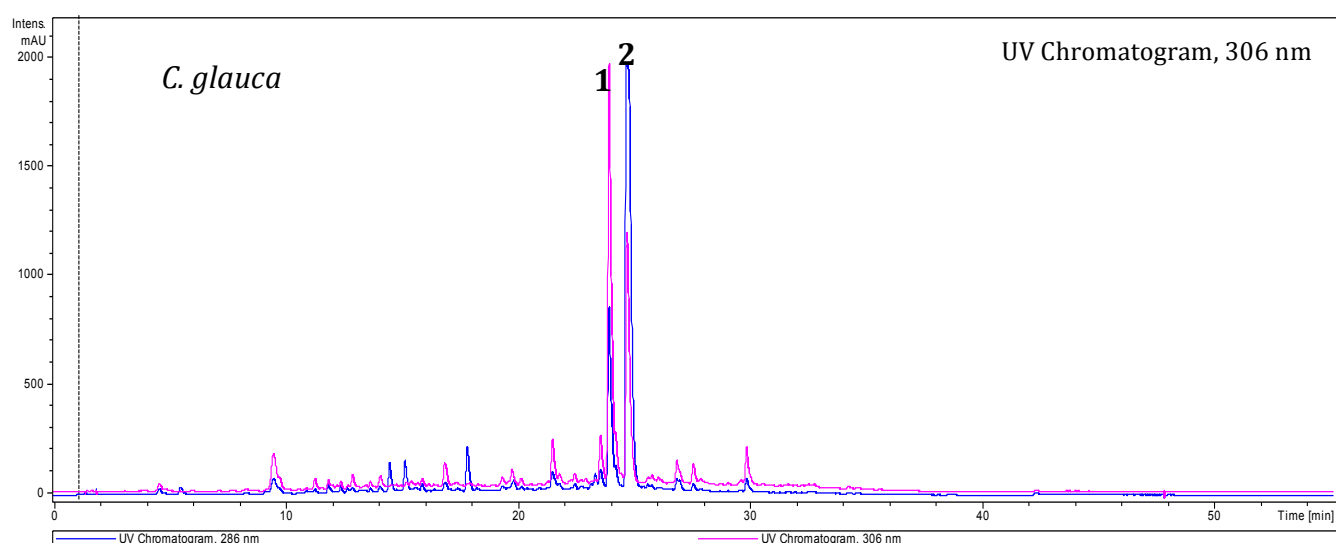
**Figure 36.** CCM d'un screening d'échantillons des parties souterraines de *Carex cuprina* (RCc), *C. hirta* (RCh), *C. glauca* (RCg), *C. capillacea* (RCC) et *C. oshimensis* (RCO). TP : témoin (E)-picéide ; TR : témoin (E)-resvératrol

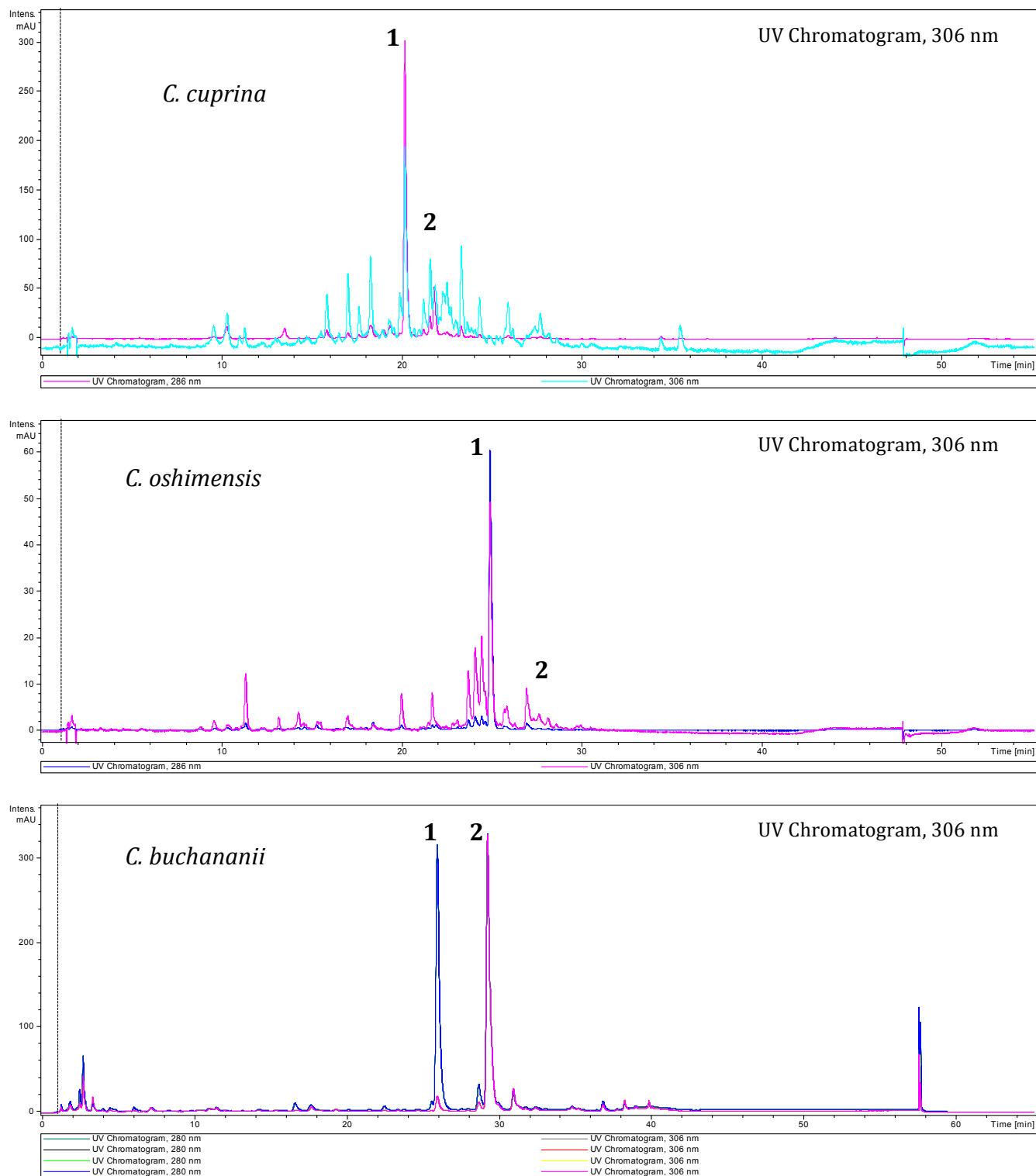
La plaque a été observée à 366 et 254 nm avec photographie en chambre noire, puis pulvérisée sous hotte à flux laminaire avec une solution d'anisaldéhyde sulfurique (anisaldéhyde/éthanol/acide sulfurique 5/90/5) chauffée avec un sèche-cheveux. La vanilline sulfurique a donné des taches plus colorées et a fini par être retenue pour les autres analyses.



## 1.2. CLHP analytique et CL-SM

Parmi tous les extraits analysés dans un premier temps on a retenu les plus riches en stilbènes et présentant des profils en CLHP analytique peu complexes avec des pics majoritaires de stilbènes (**Figure 37**). Les hypothèses tirées des résultats de l'analyse des données obtenues concernant les temps de rétention des pics majoritaires et des masses ( $m/z$ ) par CLHP analytique et CL-SM des racines de *Carex hirta*, *C. cuprina*, *C. glauca*, *C. capillacea*, *C. buchananii* et *C. oshimensis* sont représentées dans le **tableau 5** un peu plus loin.





**Figure 37.** Chromatogrammes CLHP des extraits des racines de 5 espèces différentes du genre *Carex*.

**Tableau 5.** Résultats tirés de l'analyse par CLHP analytique et CL-SM des parties racinaires de six *Carex*. Les temps de rétention ( $t_r$ ) et les masses sont indiquées.

<i>Carex</i>	Pic n°	$t_r$ (min)	$[M+H]^+$ $m/z$	N° composé
<i>Carex hirta</i>	1	13,5	553	1
	2	26,0	907	6
<i>Carex cuprina</i>	1	22,6	941	2
	2	24,3	925	4
<i>Carex capillacea</i>	1	15,0	229	Resvératrol
	2	26,0	907	6
<i>Carex buechananii</i>	1	24,0	925	4
	2	25,9	907	6
<i>Carex oshimensis</i>	1	25,1	679	3
	2	25,3	681	5
<i>Carex glauca</i>	1	24,0	681	5
	2	24,6	679	3

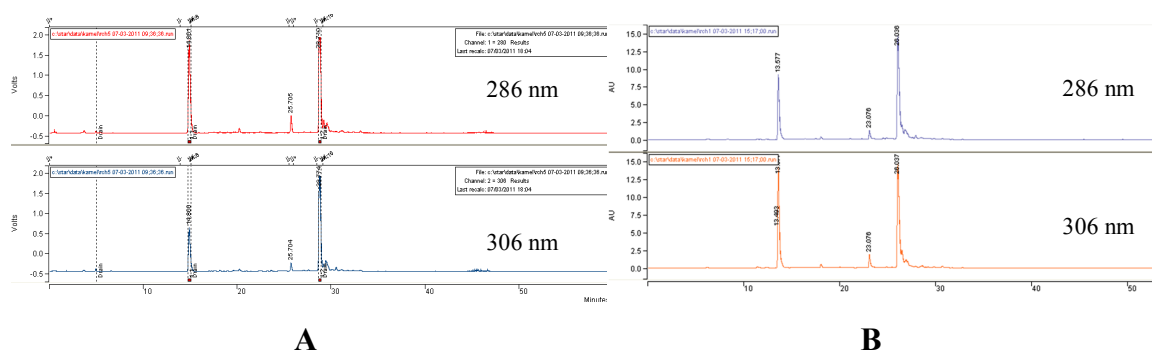
L'interprétation des spectres UV reste limitée par rapport à la LC-MS et à la RMN. Si la quantité de produit est trop élevée au niveau du détecteur, l'appareil sature et le spectre présente alors de nombreux pics. Sur les spectres d'absorption UV-visible, les stilbènes ont généralement deux maximums, le deuxième étant plus faible. Plus le noyau aromatique est substitué, hydroxylé, en position *trans*, plus l'absorption est déplacée vers les grandes longueurs d'onde. Les stilbènes en *cis* (*Z*-) ont une absorption maximale vers 286 nm et les stilbènes en *trans* (*E*-) vers 306 nm. Les analyses par CCM, par CLHP analytique et LC-MS et les analyses des spectres UV montrent que les principaux pics des parties racinaires des différents *Carex* (**Figure 37**) sont des stilbènes. De plus, les pics sont assez bien séparés sur les chromatogrammes et cela permet d'espérer une bonne séparation par CLHP préparative.

### 1.3. CLHP préparative

#### 1.3.1. *Carex hirta*

L'extrait de racines de *Carex hirta* montre dans une première étude chromatographique un profil simple et la présence au moins de deux stilbènes en quantité importante. En effet, il présente pour deux taches sur la CCM (**Figure 36**) une coloration bleu-violet caractéristique de la révélation d'un stilbène après pulvérisation à l'anisaldéhyde, dont une, très foncée, ce qui laisse à penser que la molécule est présente en grande quantité.

Le chromatogramme par CLHP des parties souterraines de *Carex hirta* n'est pas trop complexe et confirme la présence de deux composés potentiels en grande quantité (**Figure 37**) avec un signal supérieur à 1600 mAU pour le pic 1 et à 2000 mAU pour le pic 2. Ces deux pics pourraient correspondre à deux stilbènes et comme ils absorbent beaucoup plus à 306 qu'à 286 nm, ils pourraient s'agir de deux formes *trans*. Ils semblent à portée de purification directe par CLHP préparative et semi préparative sans étape supplémentaire. Une extraction préparative à partir de 20 g de MF a donc été réalisée et nous permet l'isolement des deux pics par CLHP préparative (**Figure 38**). Les légères variations des temps de rétention sont dues à l'appareillage, à la différence de taille des colonnes et aux débits d'élution entre les CLHP analytique et préparative (**Tableau 6**).



**Figure 38.** CLHP semi-préparative (A) et CLHP préparative (B) des parties souterraines de *Carex hirta* à 286 et 306 nm

**Tableau 6.** Pics récupérés par CLHP préparative et semi préparative des parties souterraines de *Carex hirta*.

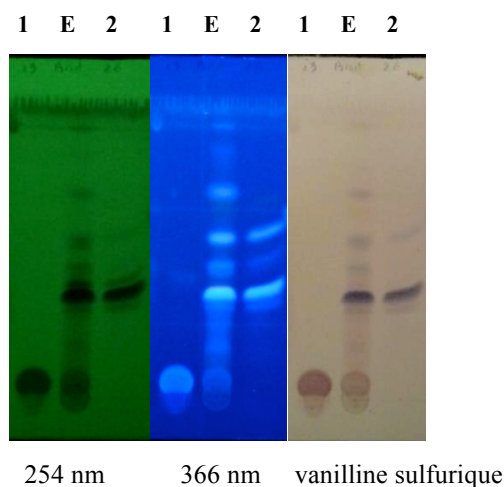
Pic n°	CLHP semi-préparative $t_r$ (min)	CLHP préparative $t_r$ (min)
1	14	13,5
2	28	26,0

Le composé correspondant au pic n°1 sortant à 13,5 min, présente en CL-SM un ion principal compris entre  $m/z$  552,5 et 553,5. Le spectre en ionisation positive douce montre que l'ion principale  $[M+H]^+$  est à  $m/z$  553,0. Par  $MS_2$  le pic à  $m/z$  553 et donne un ion fragmenté à  $m/z$  391 (-162) qui pourrait ensuite conduire à  $m/z$  229 (-162). La fragmentation du pic 391 correspond à une  $MS_3$ , car c'est une fragmentation d'un fragment du composé de départ. On y trouve la masse 229 du resvératrol, 162 pourrait correspondre à un hexose. Il pourrait donc s'agir d'un dérivé diglycosylé de resvératrol.

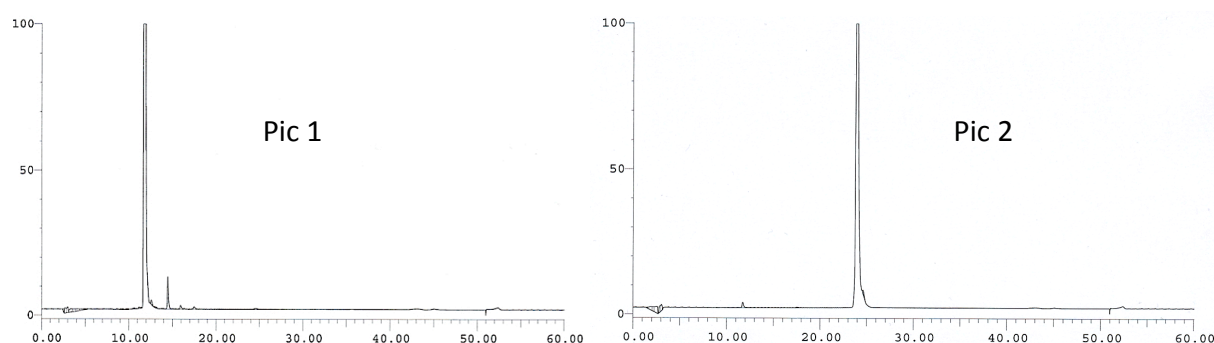
Le grand pic, qui sort à 26 min par CLHP préparative présente un ion principal entre  $m/z$  906,5 et 907,5. Le spectre en ionisation positive montre que l'ion principal  $[M+H]^+$  fait 907,0  $\mu$ na. On est proche d'un oligomère de resvératrol rencontré déjà chez divers *Carex*. Il pourrait donc s'agir d'un tétramère. En plus, les spectres UV à 286 et 306 nm indiqueraient que ce tétramère est en forme *trans*.

Après concentration et lyophilisation, nous avons obtenu à partir du pic1 (à 13,5 min) 11,5 mg, soit un rendement de 230 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF, et du pic 2 (à 26,0 min) 45,4 mg, soit un rendement de 908 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF.

Nous avons ensuite vérifié la pureté des produits par CCM et CLHP analytique (Figures 39 et 40).



**Figure 39.** CCM des produits récupérés après CLHP préparative des parties souterraines de *Carex hirta*. **1** : pic 1 ; **E** : extrait avant CLHP ; **2** : pic 2.



**Figure 40.** Contrôle de pureté par CLHP analytique des produits correspondant au pic 1 et au pic 2. Chromatogramme enregistré sur 60 min à 306 nm.

Ensuite, nous avons utilisé la RMN pour connaître l'identité de ces molécules. Nous avons dissout de 2 à 4 mg dans un solvant deutéré pour RMN, le méthanol D4 de EURISOTOP ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $d = 0,89$ ).

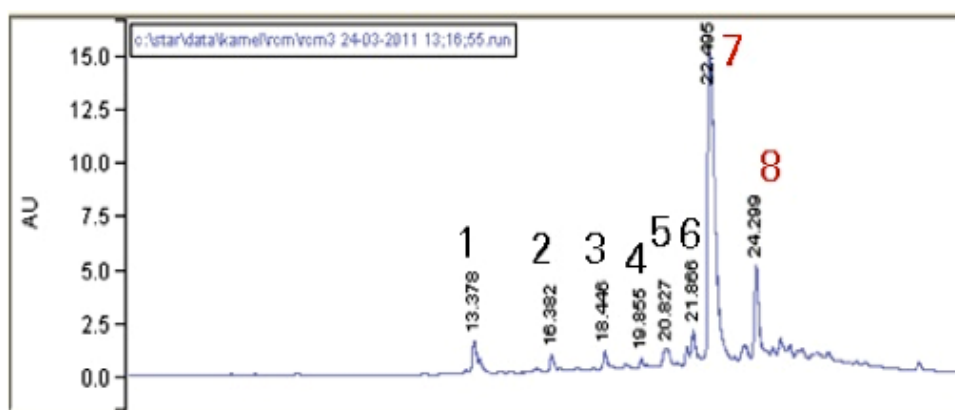
L'interprétation des spectres par RMN du proton et du  $^{13}\text{C}$  (cf. partie RMN) et la littérature ont permis de confirmer :

- le pic 1 de  $t_r = 13,5$  est du 3,5-diglucosyl-resvératrol (1).
- le pic 2 de  $t_r = 26,0$  est le *E*- miyabénol A (6).

### 1.3.2. *Carex cuprina*

Le profil CCM des parties souterraines de *Carex cuprina* (**Figure 36**) montre aussi la présence possible de stilbènes à des concentrations importantes (couleur bleu violet après révélation à l'anisaldéhyde). Le profil en CLHP analytique et le spectre UV montrent là aussi la présence d'au moins deux stilbènes pouvant se prêter à une bonne séparation (**Figure 37**).

Une extraction préparative des parties racinaires de *Carex cuprina* pour l'obtention des produits purs a été réalisée. Après la lyophilisation de l'extrait brut, on obtient 78,8 mg de poudre pour 10 g de MF soit un rendement de  $788 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$  de MF. On a récupéré à partir de la purification par CLHP préparative huit pics (**Figure 41**, **Tableau 7**), les plus importants étant les pics 7 et 8.



**Figure 41.** Chromatogramme CLHP préparative des parties souterraines de *Carex cuprina*.

**Tableau 7.** Pics récupérés par CLHP préparative de *Carex cuprina*.

Pic n°	t <sub>r</sub> (min)
1	13,37
2	16,38
3	18,44
4	19,85
5	20,82
6	21,86
7	<b>22,49</b>
8	<b>24,29</b>

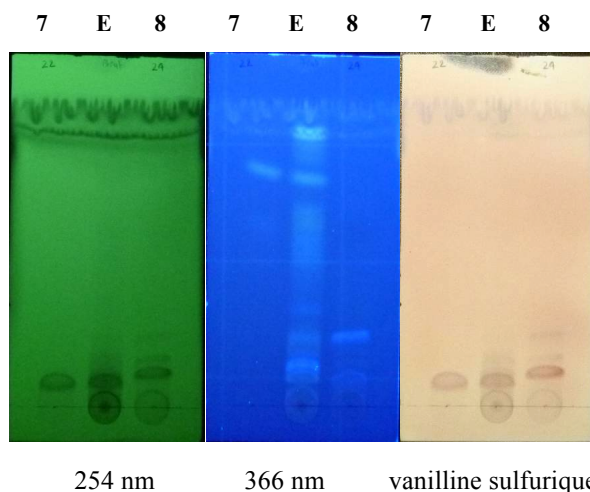
Le plus grand pic est le n° 7 (il correspond au pic 1 sur la **figure 37** pour *C. cuprina*). Par CL-Masse, il sort à 22,5 min et présente un ion net compris entre 940,5 et 941,5. Le spectre en ionisation positive montre que l'ion principale  $[M+H]^+$  fait 941,0  $\mu$ na. Par SM1, on trouve un pic important à  $m/z$  925, soit un départ de  $941 - 16 = 925$   $\mu$ na qui pourrait correspondre à un tétramère de resvératrol par exemple le kobophénol déjà connu chez divers *Carex*. Il pourrait donc s'agir d'un tétramère hydroxylé de resvératrol.

Le spectre en ionisation positive du deuxième pic (pic n°8 qui pourrait correspondre au pic 2 sur la **figure 37** pour *C. cuprina*) qui sort à 24,3 min en CLHP préparative, montre un ion principal  $[M+H]^+$  qui fait 925,0  $\mu$ na. Il pourrait correspondre au kobophénol A rencontré chez divers *Carex*.

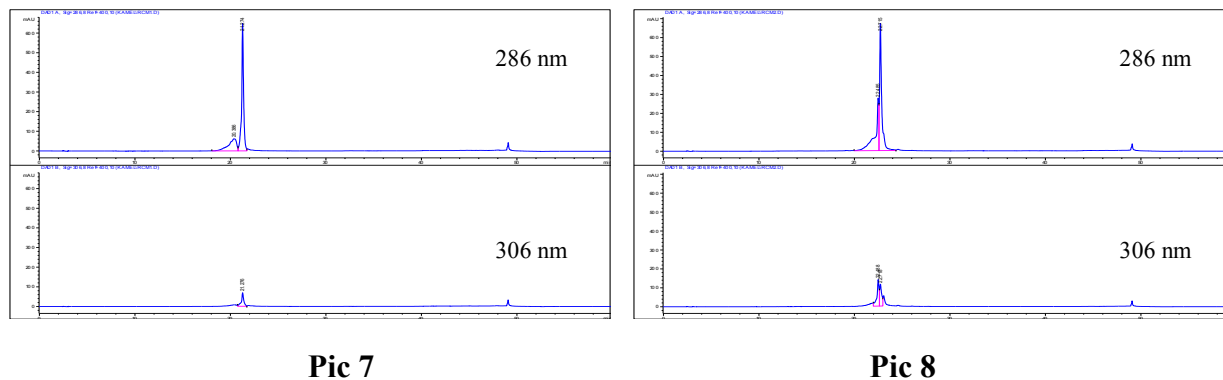
Après lyophilisation, on n'obtient un produit pur que pour les pics 7 et 8 pour lesquels nous avons pu réaliser ensuite des analyses par RMN.

Nous avons obtenu à partir du pic 7 majoritaire (qui correspondrait à un tétramère hydroxylé) 25,3 mg soit un rendement de 253 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF. Pour le pic 8 (qui correspondrait à un tétramère), nous avons récupéré 3,1 mg soit 31 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF en rendement.

Nous avons de nouveau vérifié la pureté des produits par CCM et CLHP analytique (Figures 42 et 43).



**Figure 42.** CCM de contrôle des produits récupérés par CLHP préparative dans les parties racinaires de *Carex cuprina*. **7** : pic 7, **E** : extrait avant CLHP, **8** : pic 8.



**Figure 43.** CLHP analytique de contrôle des produits correspondant aux pics 7 et 8 des parties racinaires de *Carex cuprina*.

De nouveau, nous avons utilisé la RMN pour connaître l'identité de ces molécules. Les produits ont été dissous dans un solvant deutéré pour RMN, le méthanol D4 de EURISO-TOP (CD<sub>3</sub>OD, d = 0,89).

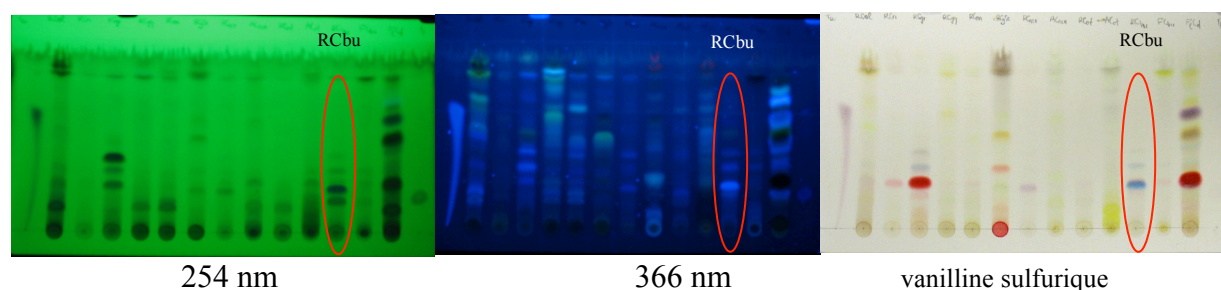
L'interprétation des spectres par RMN du proton et du <sup>13</sup>C par comparaison aux données de la littérature (cf partie RMN) ont permis de confirmer :

- le pic 7 de t<sub>r</sub> = 22,49 mn est un tétramère de resvératrol hydroxylé : le carexinol A (2).
- le pic 8 de t<sub>r</sub> = 24,29 est un tétramère de resvératrol : le kobophénol A (4).



### 1.3.3. *Carex buchananii*

Le profil par chromatographie (CCM et CLHP analytique) de l'extrait des parties souterraines de *Carex buchananii* (**Figure 44**), montre la présence de deux composés majoritaires qui peuvent être des stilbènes selon le spectre UV. Les deux pics principaux observés en CLHP analytique (**Figure 37**) semblent assez faciles à séparer par CLHP préparative.



**Figure 44.** CCM d'extraits des parties souterraines de plusieurs espèces de *Carex*  
(Légende : **RCbu** : parties souterraines de *Carex buchananii* )

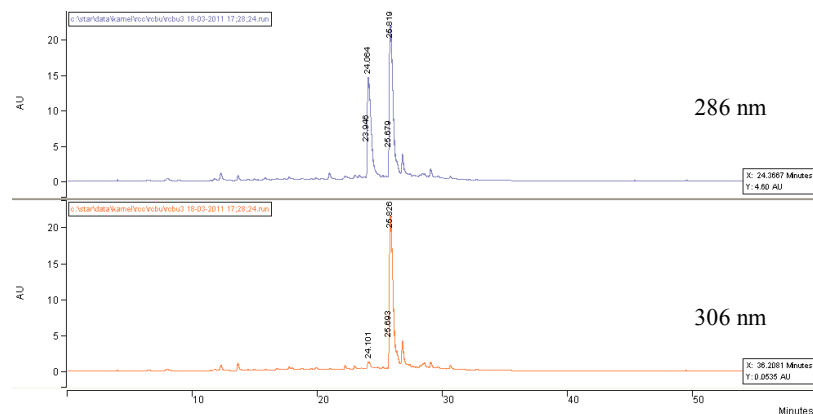
**Tableau 8.** Résultats tirés de l'analyse des données obtenues par CLHP analytique et CL-SM des parties souterraines de *Carex buchananii*

Pic n°	$t_r$ (min)	$[M+H]^+$ ( $m/z$ )	Hypothèse
1	24,0	925	tétramère de resvératrol : kobophénol A (4)
2	25,8	907	tétramère de resvératrol : miyabénol A (6)

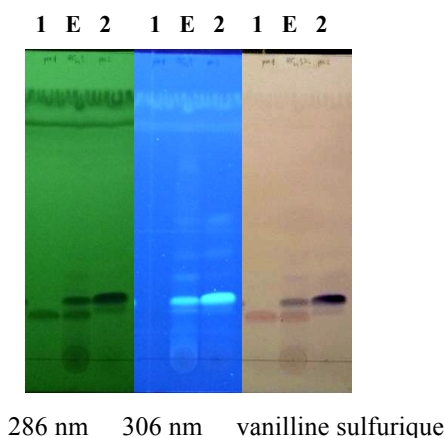
L'étude par spectrométrie de masse de l'extrait des parties souterraines de *Carex buchananii* (**Tableau 8**) montre que le pic qui sort à 24,0 min présente un ion majoritaire à  $m/z$  925 et le pic qui sort à 25,8 min présente un ion à  $m/z$  907. Il s'agit probablement de deux oligomères de resvératrol et plus particulièrement de tétramères.

Une extraction préparative à partir de 12,4 g de MF a été effectuée et deux pics ont été récupérés par CLHP préparative (**Figure 45**).

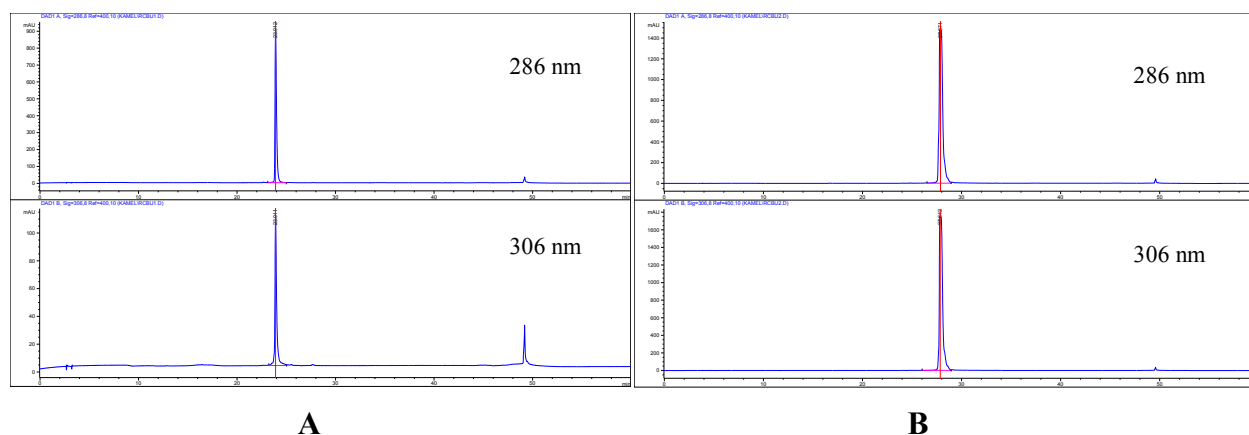
On obtient à partir du pic 1 de  $t_r = 24,0$  min 21 mg soit un rendement de 169,3 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF et du pic 2 de  $t_r = 25,8$  min 14 mg soit 112,9 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF en rendement. La pureté des produits a été vérifiée par CCM et CLHP analytique (**Figures 46 et 47**).



**Figure 45.** CLHP préparative des parties racinaires de *Carex buchananii* à 286 et 306 nm.



**Figure 46.** Contrôle de la pureté par CCM des pics récupérés par CLHP préparative de l'extract des parties souterraines de *Carex buchananii*.  
1 : pic 1, E : extrait avant CLHP, 2 : pic2

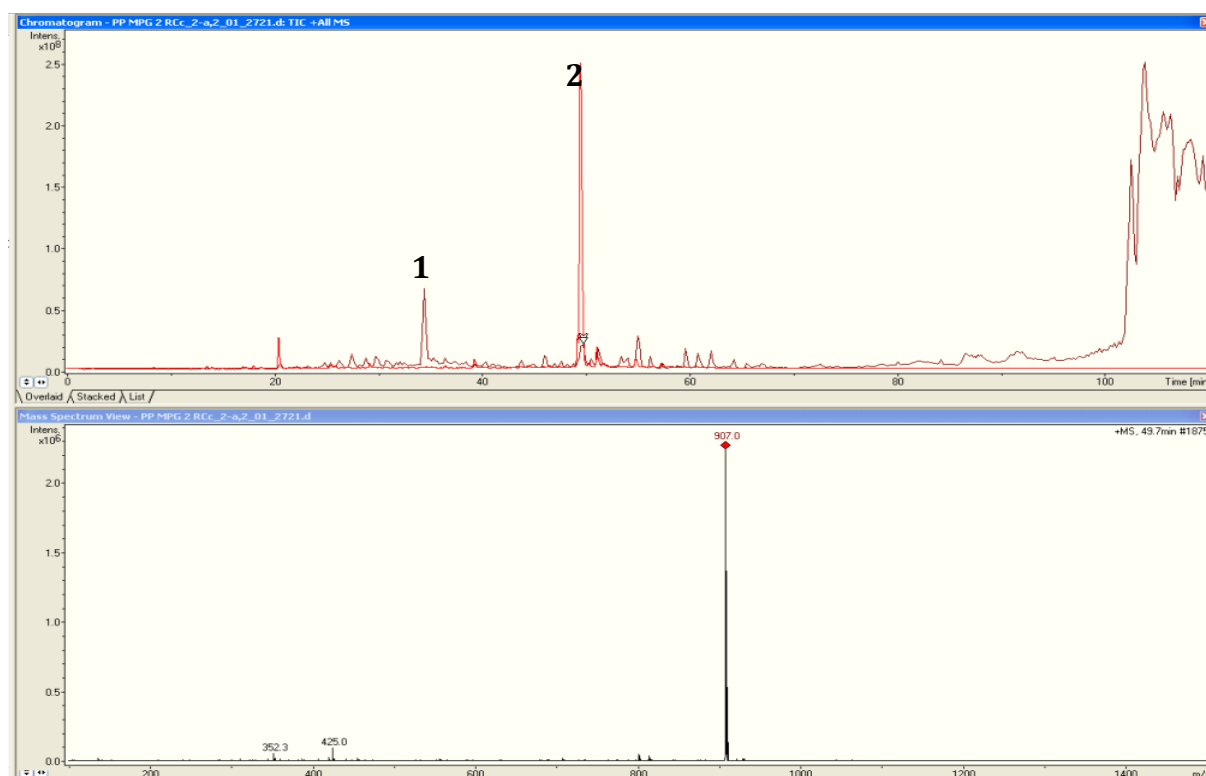


**Figure 47.** Contrôle de la pureté par CLHP analytique des pics 1 ( $t_r = 24,0$  min) et 2 (25,8 min) récupérés par CLHP préparative de l'extract des parties souterraines de *Carex buchananii*.

L'interprétation des spectres par RMN du proton (cf partie RMN) permet de confirmer que le pic 2 à 25,8 est l'(*E*)-miyabénol A ; le pic 1 est le kobophénol A.

#### 1.3.4. *Carex capillacea*

Le chromatogramme de l'extrait des racines de *Carex capillacea* montre deux pics avec des intensités importantes qui peuvent correspondre à deux stilbènes potentiels en grande quantités. Les deux pics principaux sont purifiés par CLHP préparative. Après avoir couplé les résultats à ceux trouvés en LC-MS, les masses correspondant aux pics des chromatogrammes en CLHP sont compatibles avec des stilbènes déjà connues dans la littérature. La RMN confirme les hypothèses formulées grâce à la LC-MS (**Figure 48**) et permet d'affirmer que cet extrait contiendrait du miyabénol A (pic n°1  $m/z = 907$ ) et un resvératrol diglucosylé ( $m/z = 553$ ) qui correspond au pic n°2 sur la figure 48.

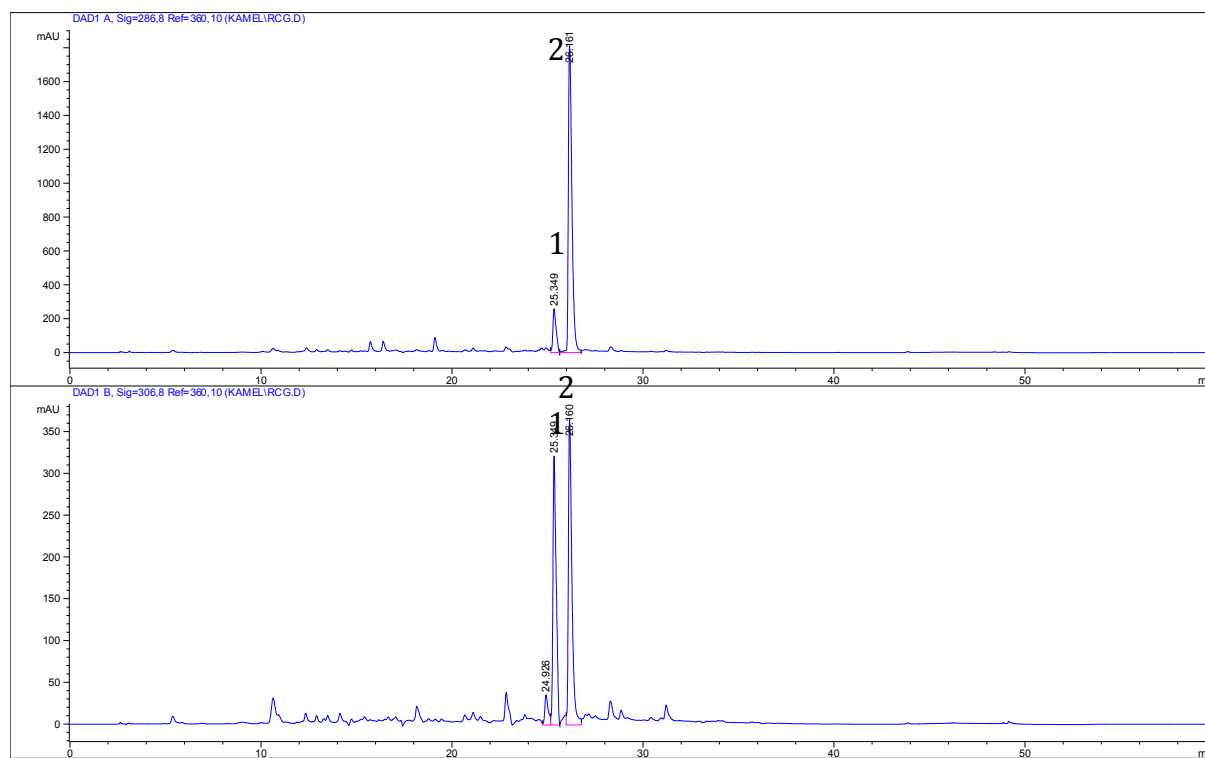


**Figure 48.** CLHP des parties souterraines de *Carex capillacea* à 306 nm et LC-MS correspond au pic 2.

Lors d'une première série de purifications par CLHP préparative, on n'a obtenu que 4,6 mg de poudre à partir de 363 mg de MS (correspondant à 2,42 g de MF). Puis, à partir d'une deuxième série de purifications par CLHP préparative, on obtient finalement 20 mg de (*E*)-miyabénol A à partir de 10 g de MF (soit un rendement de 200 mg.100 g<sup>-1</sup> de MF).

### 1.3.5. *Carex glauca*

L'étude par CLHP analytique (**Figure 49**) et l'analyse du spectre UV des parties racinaire de *Carex glauca* montre la présence de stilbènes avec des intensités importantes. Ces deux pics sont assez proches mais devraient être séparables par CLHP préparative.



**Figure 49.** Chromatogramme CLHP à 306 et 286 nm de *Carex glauca* (racine).

**Tableau 9.** Résultats tirés de l'analyse des données obtenues par CLHP analytique et CL-SM des parties souterraines de *Carex glauca*.

Pic n°	t <sub>r</sub> (min)	m/z [M+H] <sup>+</sup>
1	24,0	681
2	24,6	679

Les analyses par spectrométrie de masse (**Tableau 9**) montrent que le pic 1 qui sort à 24,0 min présente un ion principal en ionisation positive qui fait 681 u.a. Ce pic 1 absorbe plus à 306 qu'à 286 nm. On est donc sans doute en présence d'un trimère de resvératrol sous forme *trans*. Pour le deuxième pic qui sort à 24,6 min, son spectre, lui aussi en ionisation

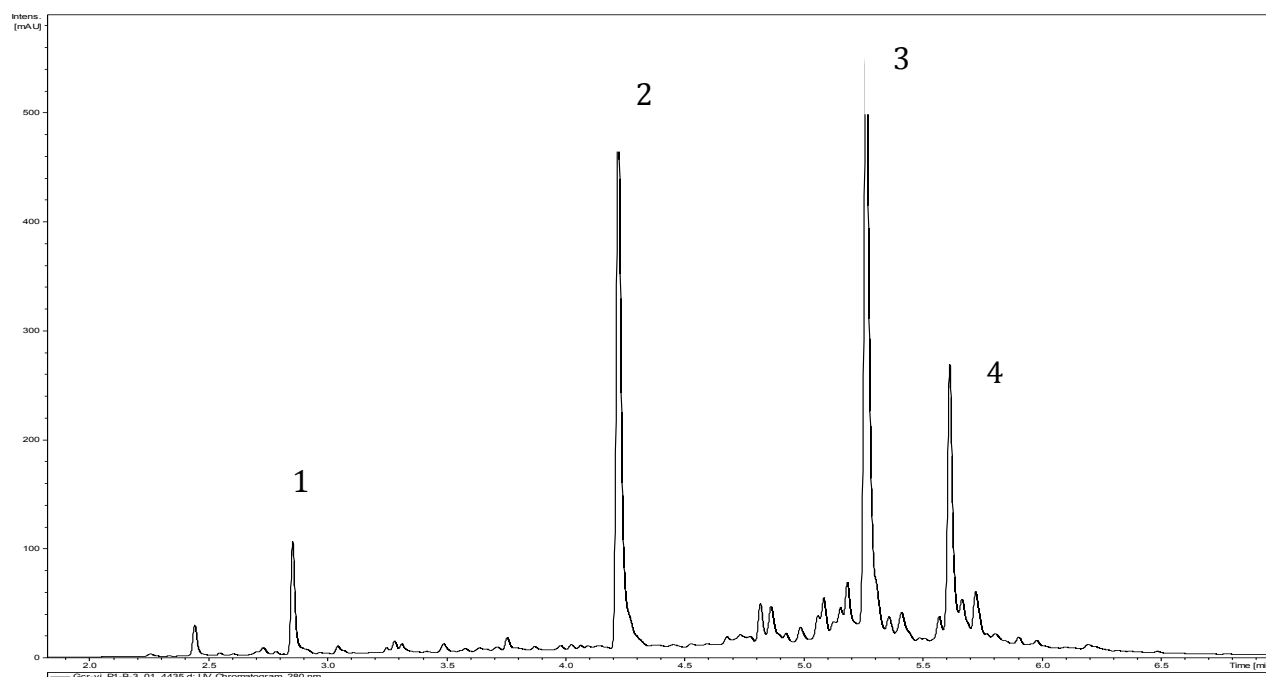
positive, montre un ion principal qui fait 679,0  $\mu$ na avec une dimérisation à 1357,2 il s'agit très certainement de l' $\alpha$ -viniférine rencontrée chez divers *Carex*.

Une purification par CLHP préparative à partir de 10 g de matière fraîche nous a permis d'avoir 4 mg de pic 1 et 14 mg de pic 2.

Les deux pics sont identifiés par LC-Masse et RMN (cf partie RMN) : le pic 1 est le (*E*)-miyabénol C et le pic 2 est l' $\alpha$ -viniférine.

### 1.3.6. *Carex virgata*

L'extrait des akènes de *Carex virgata* a attiré notre attention. Une première analyse en UPLC-MS (**Figure 50**) montre un chromatogramme avec 4 pics majoritaires avec des intensités importantes. Le spectre UV de ces pics majoritaires montre des profils caractéristiques des stilbènes.



**Figure 50.** Chromatogramme UPLC à 306 nm d'un extrait de graines de *Carex virgata*.

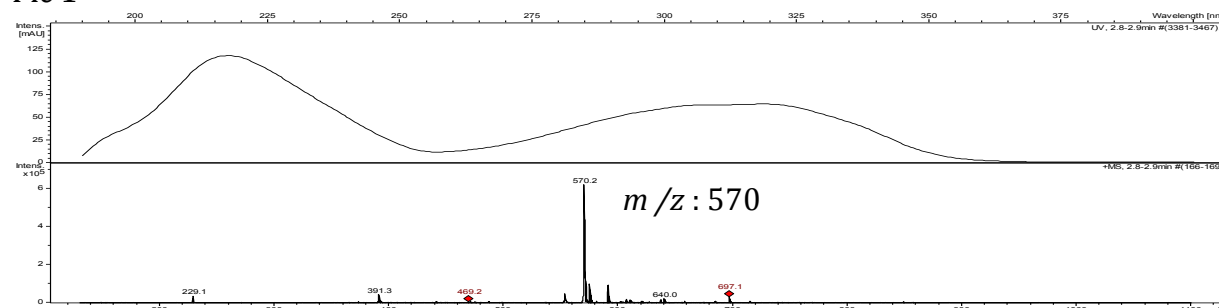
Par MS1, le pic n°1 donne un fragment de masse 553 qui pourrait correspondre à un resvératrol diglucosylé (déjà identifié chez *Carex hirta*). Le composé principal présente en EIMS une masse de 570 et deux autres pics important l'un à  $m/z$  553 et l'autre à  $m/z$  391, soit un départ de  $570 - 553 = 17$   $\mu$ na qui correspond à un OH. Il pourrait donc s'agir d'un

monomère de resvératrol diglucosylé plus un groupement OH. Par MS<sub>2</sub> le pic à  $m/z$  570 a été fragmenté et donne au début un ion à  $m/z$  553 (-17)  $\mu$ na qui pourrait ensuite conduire à l'ion à  $m/z$  391 (-162). La fragmentation du pic 391 correspond à une MS<sub>3</sub>, car c'est une fragmentation d'un fragment de départ, on retrouve la masse 229 du resvératrol. A partir de ces données de LC-MS; le composé qui correspond au pic 1 pourrait correspondre à un monomère de resvératrol diglucosylé et hydroxylé.

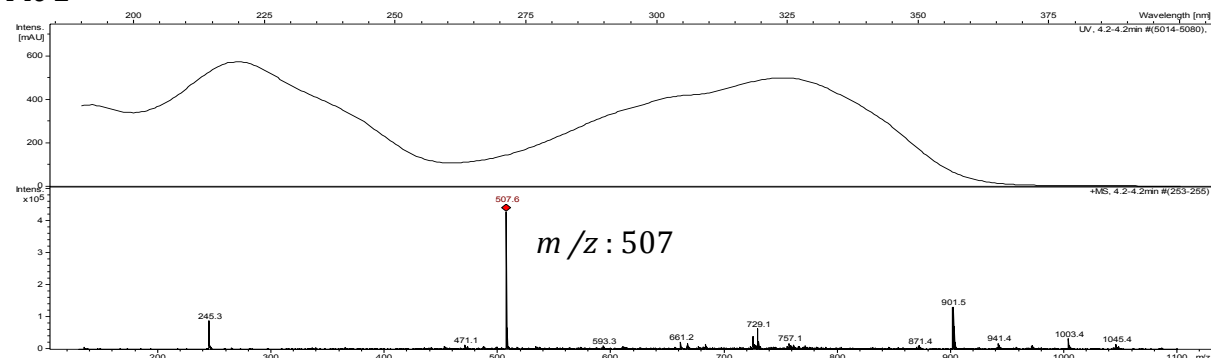
Le spectre en ionisation positive du pic 2 montre que l'ion principal fait 507  $\mu$ na et la fragmentation en MS2 donne 245  $\mu$ na. Le composé correspondant à ce pic 2 pourrait être un dimère de stilbène.

Ensuite, pour les deux derniers pics 3 et 4, les spectres indiquent une masse de 907 pour le pic 3 pouvant correspondre à un tétramère de resvératrol et une masse pour le pic 4 de 455 qui pourrait correspondre à un dimère. (**Figure 51** et **Tableau 10**)

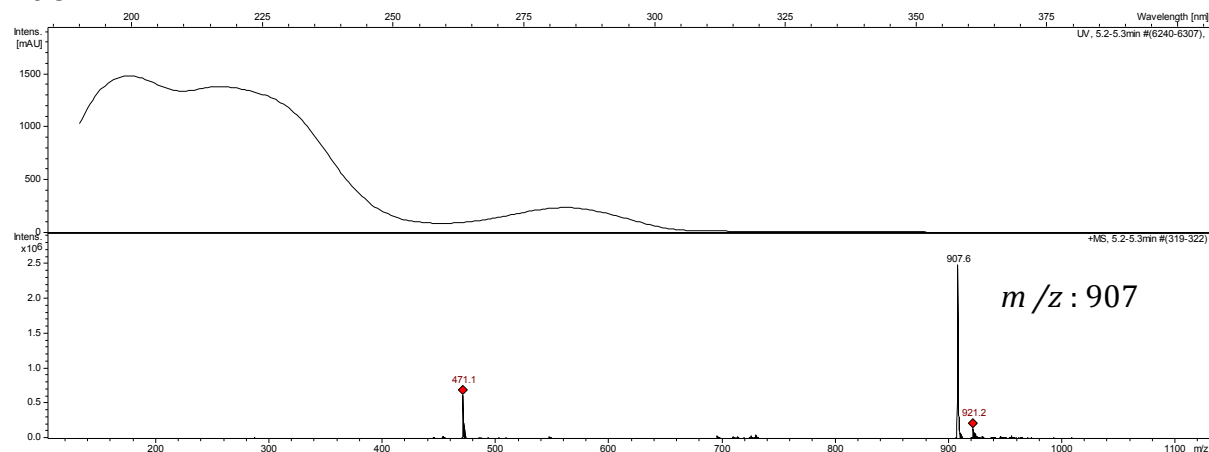
Pic 1



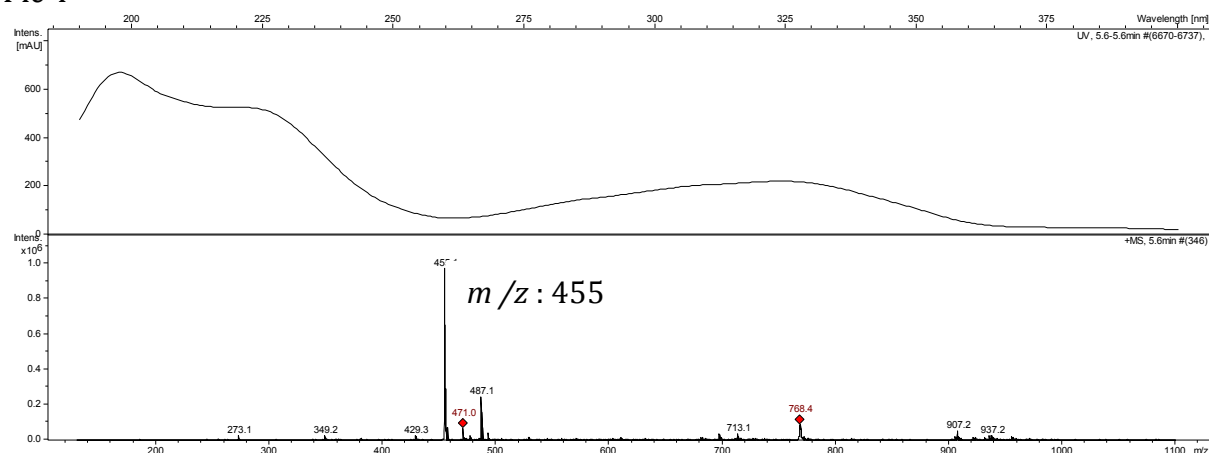
Pic 2



Pic 3



Pic 4



**Figure 51.** Spectres UV et SM des pics 1, 2, 3 et 4 obtenus par CL-MS d'un extrait d'akènes de *Carex virgata*

**Tableau 10.** Résultats tirés de l'analyse des données obtenues par CLHP analytique et CL-SM des akènes de *Carex virgata*

Pic n°	$t_r$ (min)	$m/z$ $[M+H]^+$
1	11,9	570
2	17,8	507
3	21,6	907
4	23,9	455

Nos analyses par CCM, CLHP analytique, préparative et LC-MS ont permis de montrer la présence d'un *trans*-resvératrol diglucosylé et de *trans*-miyabénol A dans RCh et RCc.

Meng *et al.* en 2001 ont trouvé du *cis*-miyabénol A, du *cis*-miyabénol C et du kobophénol B, dans les graines de *Carex pendula*. Notre travail montre la présence de *trans*-miyabénol C et de l'alpha-viniférine dans RCg et RCO, du kobophénol A dans les racines de *Carex buchananii* et un nouveau tétramère hydroxylé (carexinol A) dans RCc.

Le fait que les chromatogrammes de ces 6 *Carex* sont assez simples (pics distincts et non pas une forêt de pics) nous a simplifié la tâche et a évité de multiples étapes de purification (telle que l'utilisation de la CPC, chromatographie de partage centrifuge, qui aurait nécessité une plus grande quantité de matière). A partir des quantités des racines qui sont disponibles nous avons pu récupérer et purifier des quantités assez importantes de ces composés afin de faire des tests biologiques et de chercher des activités pharmacologiques de ces différents composés identifiés. Les mêmes composés ont été identifiés chez d'autres *Carex* mais les quantités de matière fraîche ne sont pas assez suffisantes pour faire des purifications. Nous nous sommes intéressées qu'aux espèces de *Carex* dont nous avons des quantités de matières fraîche importantes (**Tableau 11**).

**Tableau 11.** Tableau récapitulatif des composés identifiés et purifiés dans les parties souterraines de différents *Carex* par LC-Masse et RMN

Echantillons	t <sub>r</sub> (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Hypothèse	Quantités purifiés par CLHP-préparative en mg	RMN
<i>Carex hirta</i>	13,5	553	monomère diglucosylé	11,5	(E)-Resvératrol diglucosylé
	26	907	tétramère	45,4	(E)-Miyabénol A
<i>Carex buchananii</i>	24,0	925	tétramère	21	Kobophénol A
	25,9	907	tétramère	14	(E)-miyabénolA



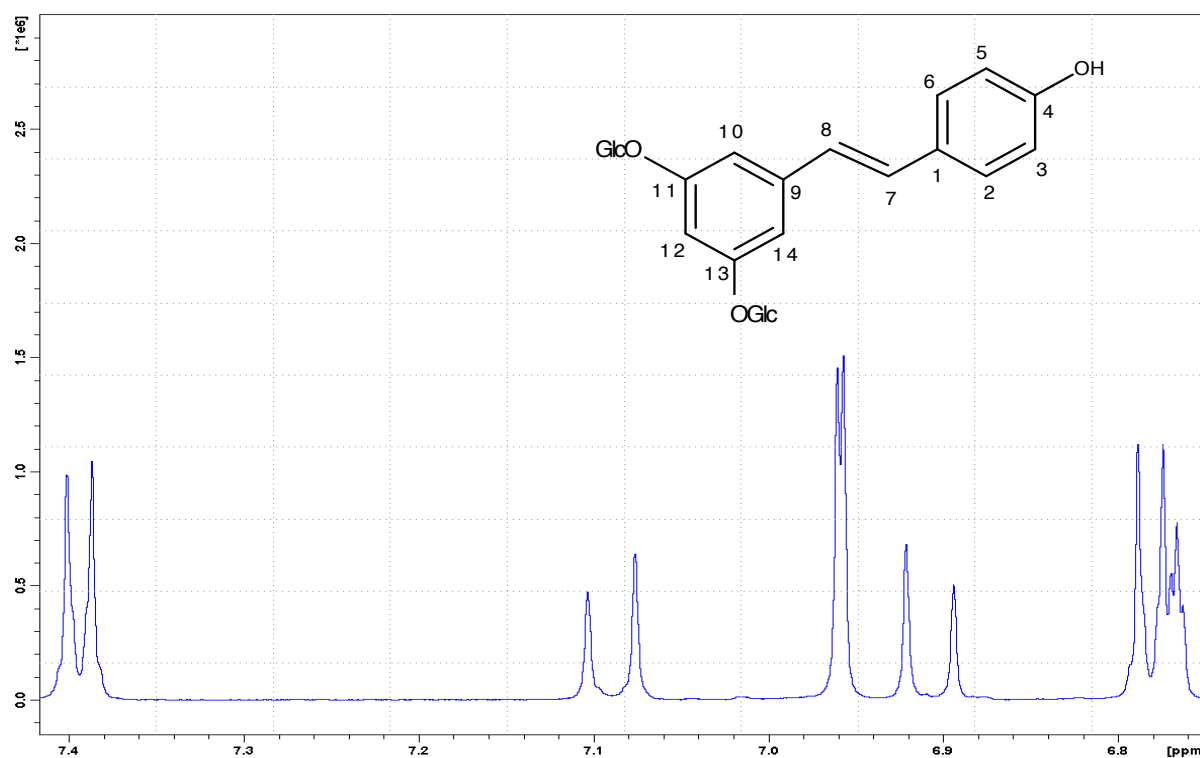
<i>Carex capillacea</i>	26,0	907	tétramère	20	(E)-Miyabénol A
<i>Carex cuprina</i>	22,6	941	tétramère	25,3	Carexinol A
	24,4	925	tétramère	3,1	Kobophénol A
<i>Carex divulsa</i>	23,1	941	tétramère	3,5	Carexinol A
<i>Carex oshimensis</i>	25,1	679	trimère	3	(+)- $\alpha$ -viniférine
<i>Carex flacca</i>	23,7	907	tétramère	1,1	(E)-Miyabénol A
	25,2	681	trimère	1	(E)-Miyabénol C
	26,0	679	trimère	5,3	(+)- $\alpha$ -viniférine
<i>Carex glauca</i>	24,0	681	trimère	4	(E)-Miyabénol C
	24,6	679	trimère	14	(+)- $\alpha$ -viniférine
<i>Carex virgata</i>	17,5	729	cyperusphénol B	Détectés	Confirmés par spectre $^1\text{H}$
	20,4	487	scirpusine B	"	"
	22,0	729	cyperusphénol B	"	"
	22,8	713	cyperusphénol A	"	"
<i>Carex ortigosa</i>	22,4	925	kobophénol A	"	"
	23,8	907	miyabénol A	"	"

<i>Carex dissita</i>	22,1	925	kobophénol A	"	"
	23,6	907	( <i>E</i> )-miyabénol A	"	"
	24,4	681	( <i>E</i> )-miyabénol C	"	"
<i>Carex tomentosa</i>	20,1	455	$\epsilon$ -viniférine	"	"
	22,6	713	cypérusphénol A	"	"
	24,1	909	tétramère	"	"
<i>Carex bohenica</i>	20,5	941	tétramère	"	"
	22,2	925	kobophénol A	"	"
	30,2	691	trimère		

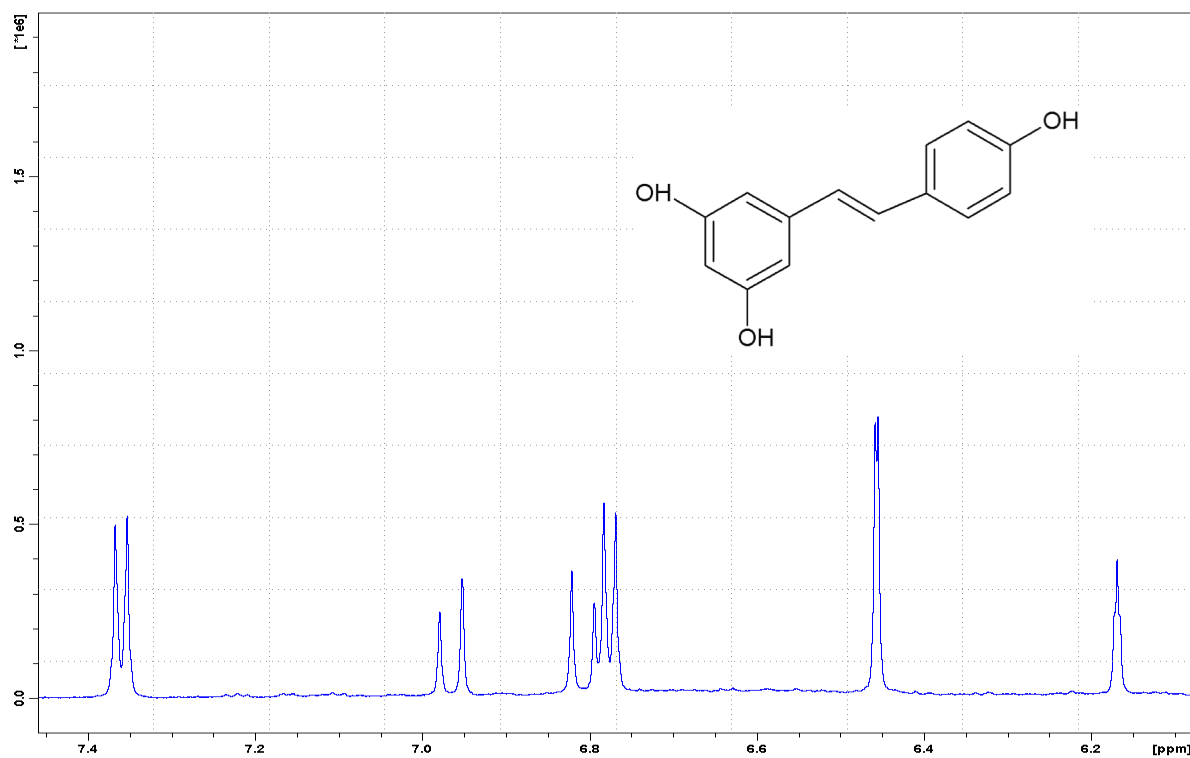
## 2. Identification des structures chimiques par RMN

La RMN est une technique très puissante pour établir la structure chimique des molécules organiques. Pour identifier la structure d'un composé simple, un spectre RMN proton peut suffire à pré-établir et déterminer des produits connus à l'aide d'une base de données. Pour des produits plus complexes et pour d'autres provoquant des superpositions de signaux, d'autres dimensions sont indispensables pour faire des cartes 2D. Dans ces études, les composés purs sont dissous dans des solvants deutérés tel que l'acétone ou le méthanol deutérés.

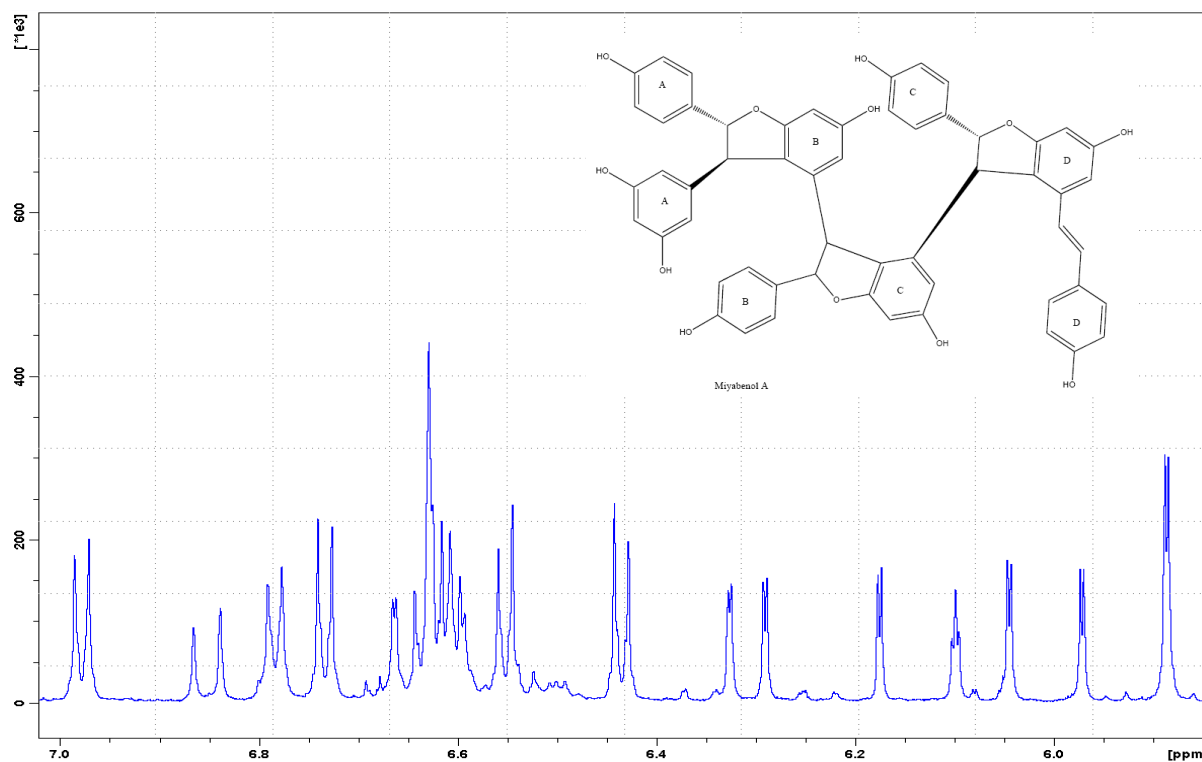
Pour tous les composés purifiés à partir des différentes *Cypéracées* sur lesquelles nous avons travaillées, une séquence proton simple puis des acquisitions de spectre 2D telles que COSY et HSQC ont été réalisées afin d'établir leur identité structurale. Nos données sont exposées dans les **Figures 52 à 63** ainsi que dans les **Tableaux 12 à 14** suivants.



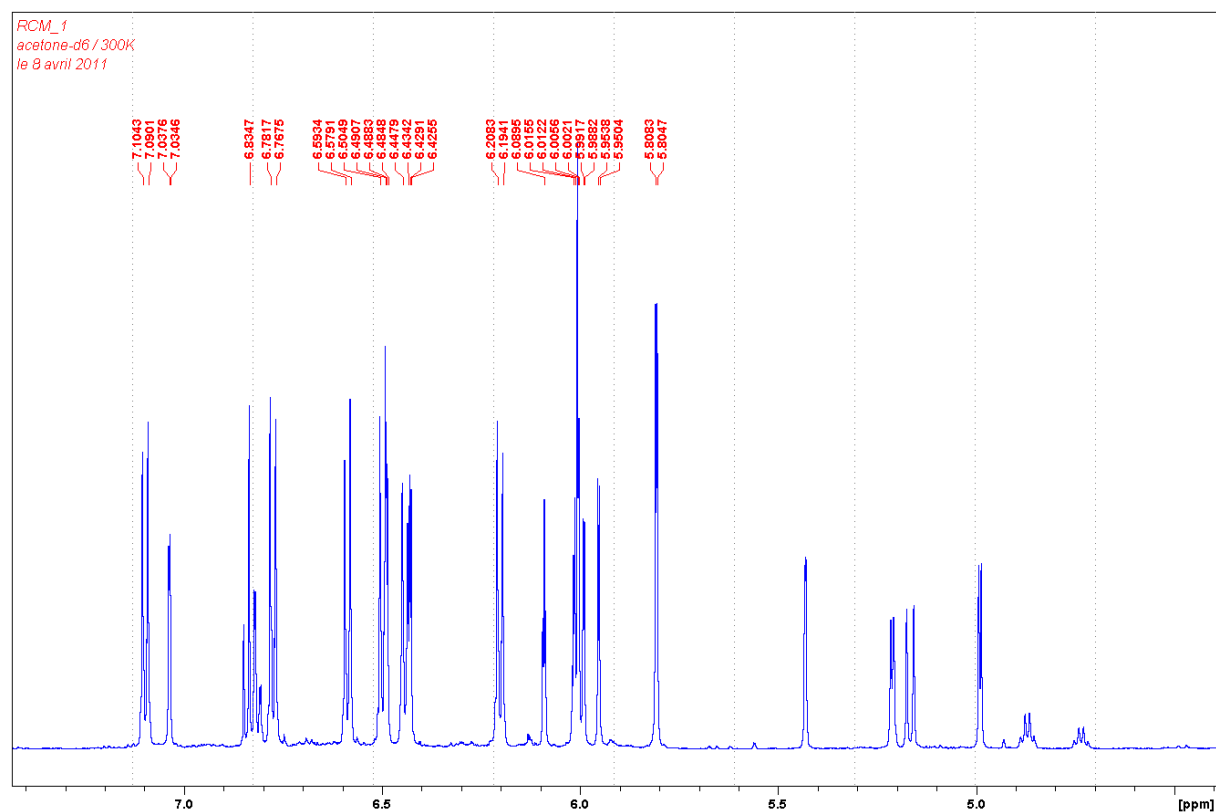
**Figure 52.** Partie du spectre  $^1\text{H}$  RMN du 1'-(*E*)-resvératrol diglucosylé dans les parties racinaires de *Carex hirta*.



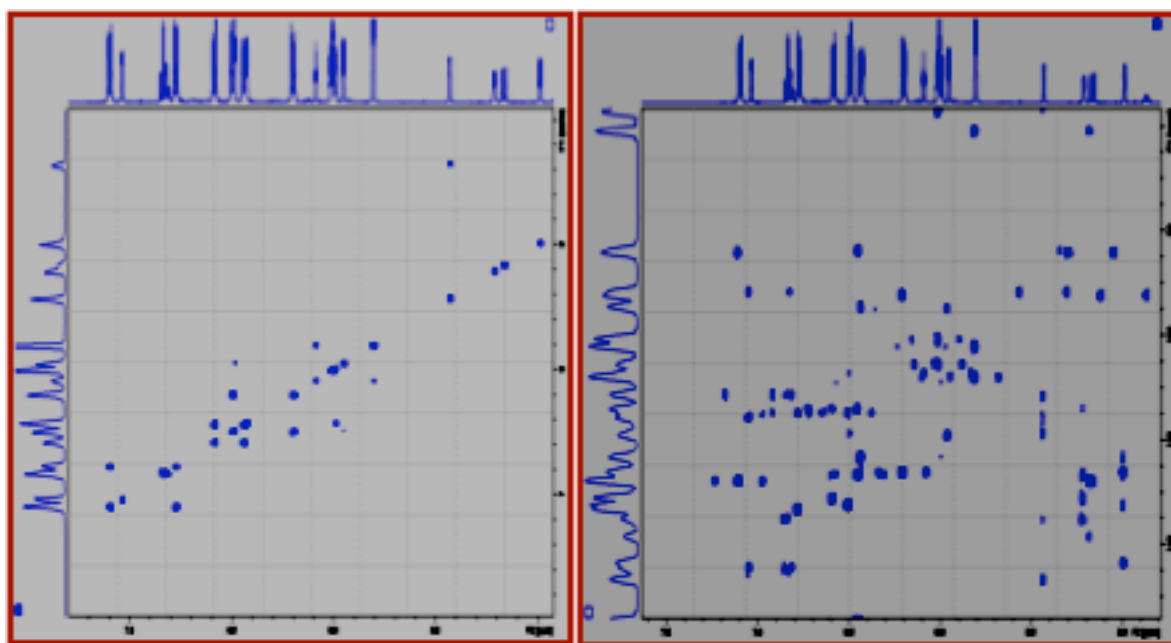
**Figure 53.** Partie du spectre  $^1\text{H}$  RMN du 1'-(*E*)-resvératrol dans les parties racinaires de *Carex hirta*.



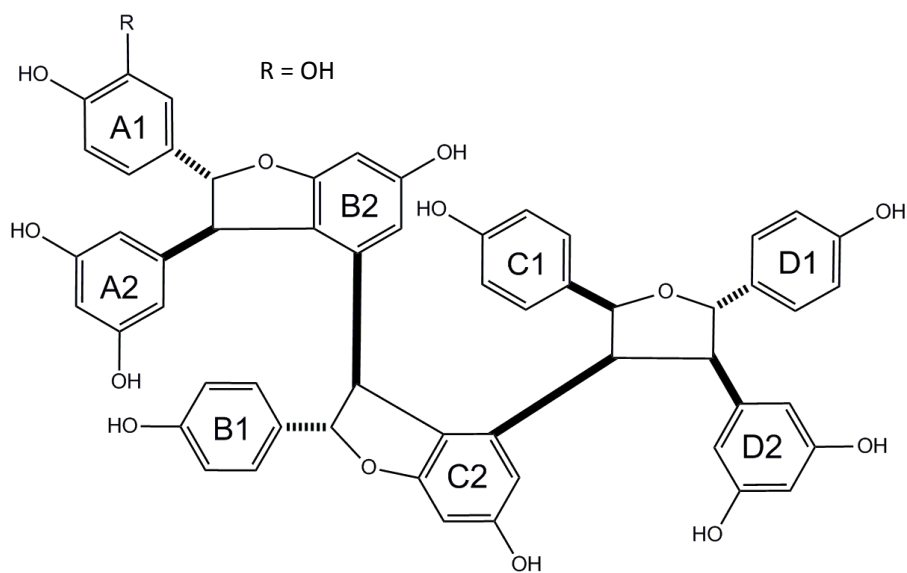
**Figure 54.** Partie du spectre  $^1\text{H}$  RMN du (E)-miyabénol A dans les parties racinaires de *Carex capillacea*.



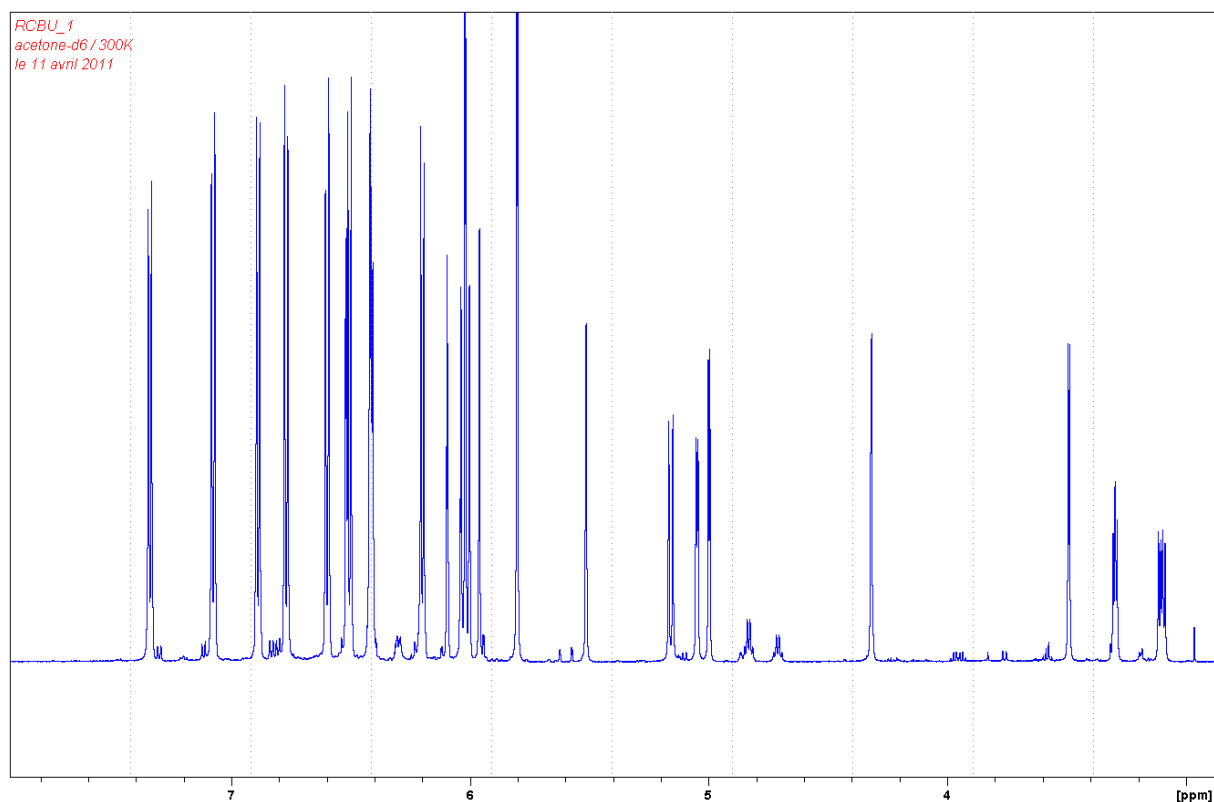
**Figure 55.** Partie du spectre  $^1\text{H}$  RMN du carexinol A dans les parties racinaires de *Carex cuprina*.



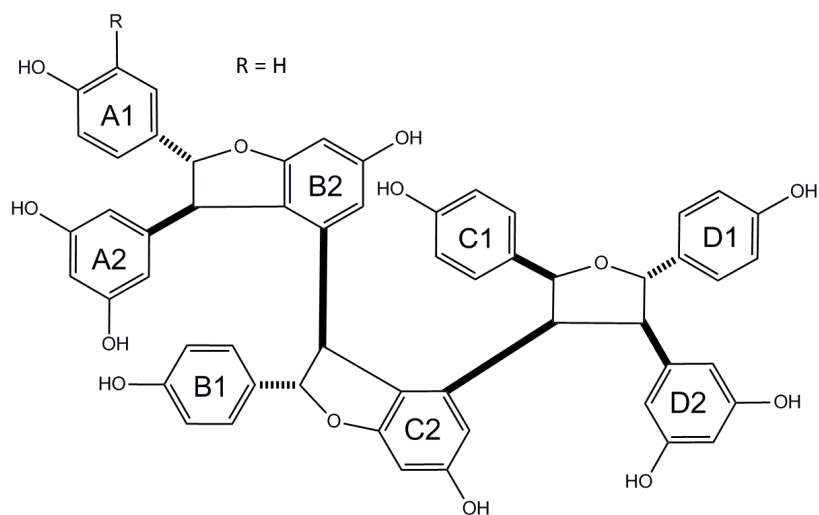
**Figure 56.** Spectres COSY et HMBC du carexinol A dans les parties racinaires de *Carex cuprina*.



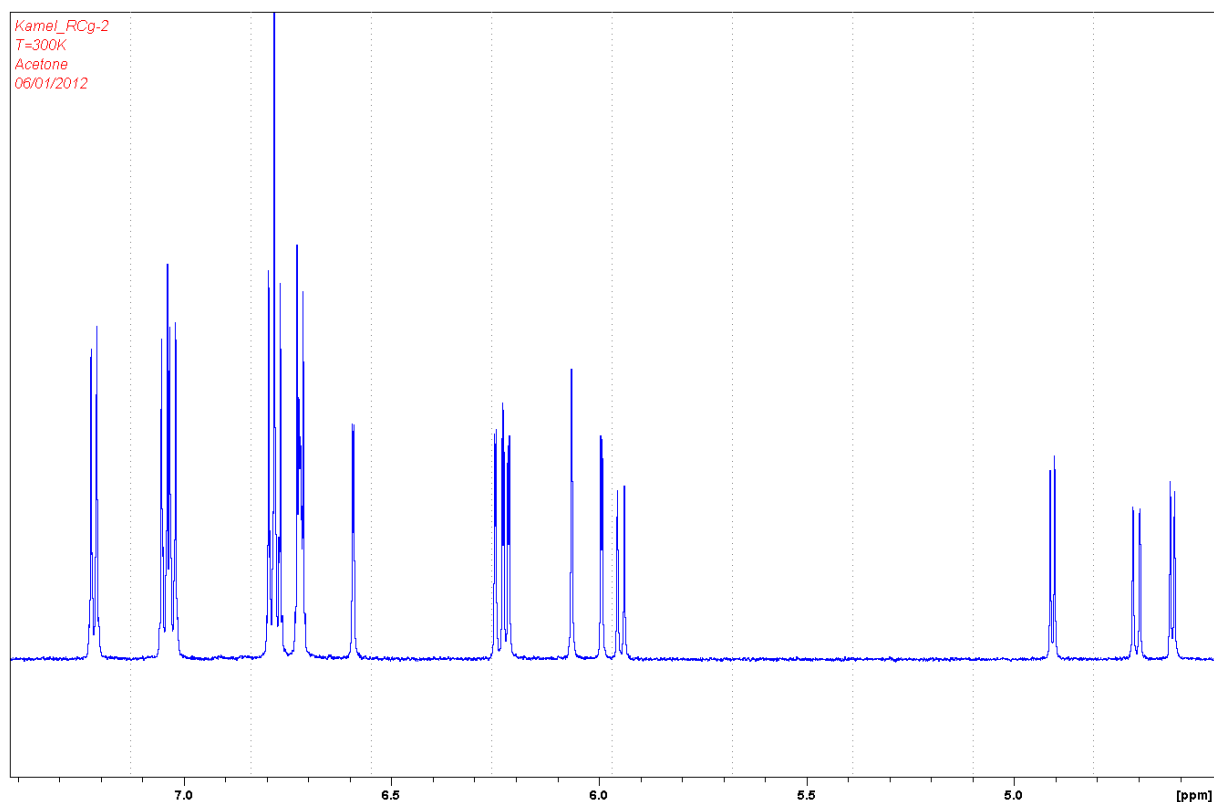
**Figure 57.** Structure chimique du carexinol A.



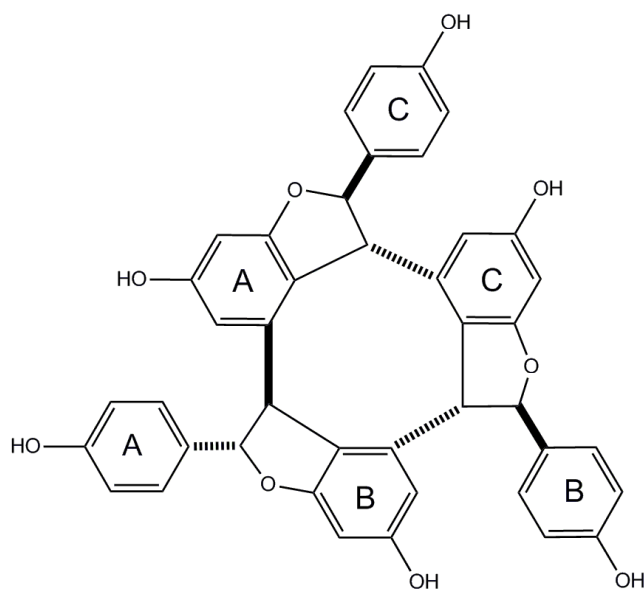
**Figure 58.** Partie du spectre  $^1\text{H}$  RMN du kobophénol A dans les parties racinaires de *Carex buchananii*.



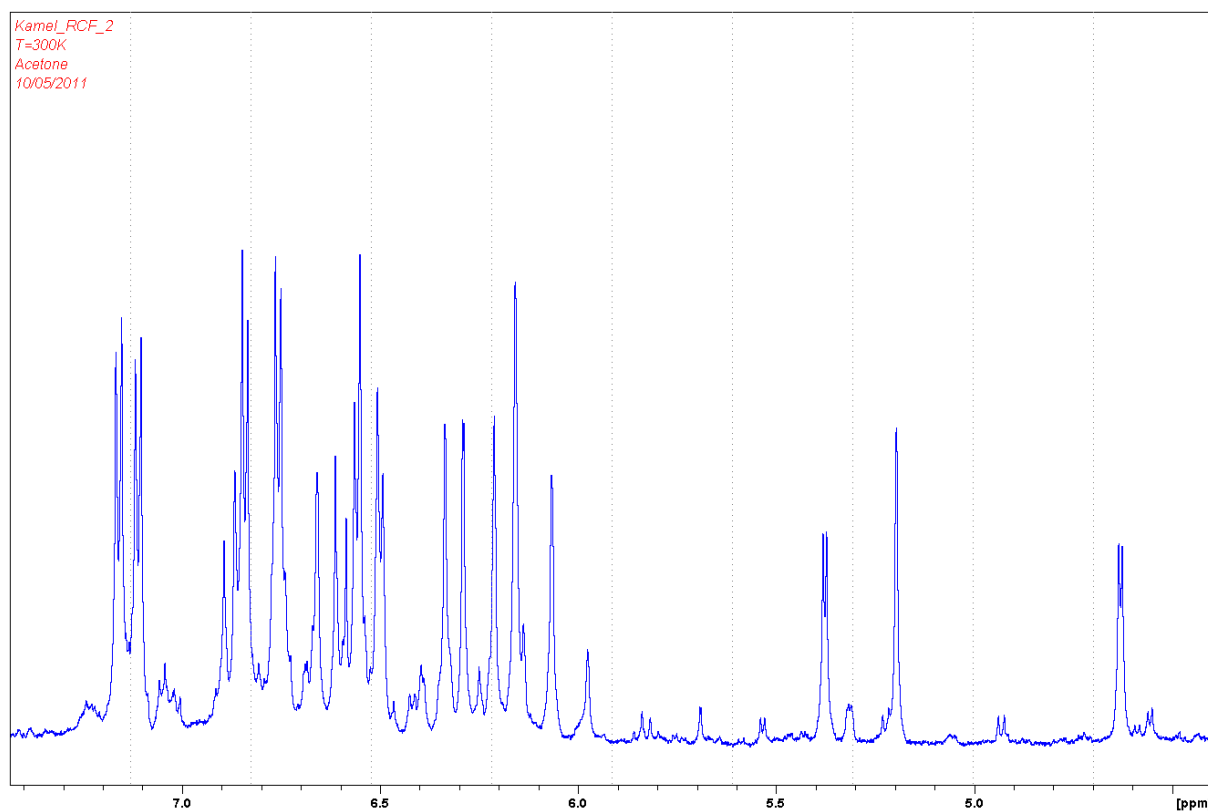
**Figure 59.** Structure chimique du kobophénol A.



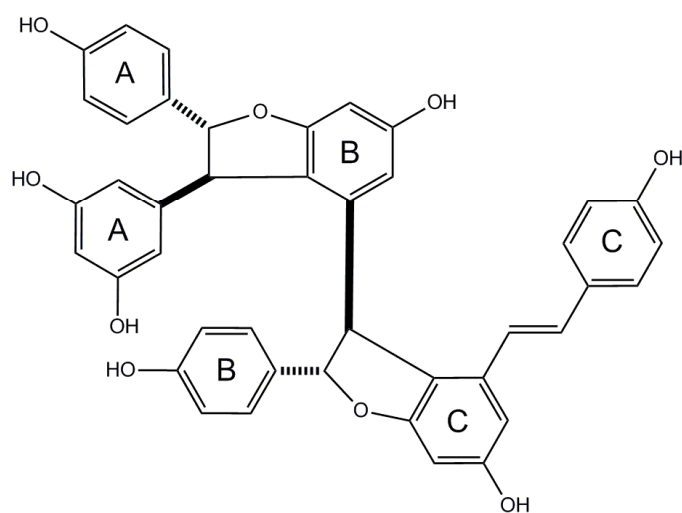
**Figure 60.** Partie du spectre proton du (+)- $\alpha$ -viniférine dans les parties racinaire de *Carex oshimensis*.



**Figure 61.** Structure chimique du (+)- $\alpha$ -viniférine.



**Figure 62.** Partie du spectre proton du (*E*)-myabénol C dans les parties racinaire de *Carex glauca*.



**Figure 63.** Structure chimique du (*E*)-myabénol C.



**Tableau 12.** Données de la RMN  $^1\text{H}$  des stilbènes identifiés chez les *Carex* à 300 K

<b>H</b>	<b>1*</b>	<b>2**</b>	<b>3**</b>	<b>4**</b>	<b>5**</b>	<b>6**</b>
2a	7.38 <i>d</i> (8)	7.04 <i>d</i> (2)	7.15 <i>d</i> (8)	7.33 <i>d</i> (8)	7.22 <i>d</i> (8)	6.81 <i>d</i> (8)
3a	6.78 <i>d</i> (8)		6.83 <i>d</i> (8)	6.88 <i>d</i> (8)	6.82 <i>d</i> (8)	6.63 <i>d</i> (8)
5a	6.78 <i>d</i> (8)	6.85 <i>d</i> (8)	6.83 <i>d</i> (8)	6.88 <i>d</i> (8)	6.82 <i>d</i> (8)	6.63 <i>d</i> (8)
6a	7.38 <i>d</i> (8)	6.82 <i>dd</i> (2;8)	7.15 <i>d</i> (8)	7.33 <i>d</i> (8)	7.22 <i>d</i> (8)	6.81 <i>d</i> (8)
7a	6.89 <i>d</i> (16)	5.43 <i>d</i> (2)	5.37 <i>d</i> (5)	5.50 <i>brs</i>	5.94 <i>d</i> (10)	5.11 <i>d</i> (6)
8a	7.08 <i>d</i> (16)	4.36 <i>d</i> (2)	4.62 <i>d</i> (5)	4.31 <i>brs</i>	4.70 <i>d</i> (10)	4.12 <i>d</i> (6)
10a	6.94 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.15 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)		5.90 <i>d</i> (2)
12a	6.75 <i>d</i> (2)	6.02 <i>t</i> (2)	6.20 <i>t</i> (2)	6.03 <i>t</i> (2)	6.24 <i>d</i> (2)	6.09 <i>t</i> (2)
14a	6.94 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.15 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.05 <i>d</i> (2)	5.90 <i>d</i> (2)
2(6)b		6.20 <i>d</i> (8)	6.49 <i>d</i> (8)	6.19 <i>d</i> (8)	7.02 <i>d</i> (8)	6.58 <i>d</i> (8)
3(5)b		6.50 <i>d</i> (8)	6.64 <i>d</i> (8)	6.50 <i>d</i> (8)	6.72 <i>d</i> (8)	6.42 <i>d</i> (8)
7b		4.99 <i>d</i> (4)	5.18 <i>brs</i>	4.98 <i>d</i> (4)	6.07 <i>brs</i>	5.08 <i>d</i> (2)
8b		3.50 <i>d</i> (4)	4.30 <i>d</i> (2)	3.48 <i>d</i> (4)	3.97 <i>brs</i>	4.68 <i>d</i> (2)
10b						
12b		6.49 <i>d</i> (2)	6.32 <i>d</i> (2)	6.51 <i>d</i> (2)	6.22 <i>d</i> (2)	6.31 <i>d</i> (2)
14b		5.95 <i>d</i> (2)	6.05 <i>d</i> (2)	5.95 <i>d</i> (2)	6.00 <i>d</i> (2)	5.97 <i>d</i> (2)
2(6)c		6.45 <i>d</i> (8)	7.10 <i>d</i> (8)	6.40 <i>d</i> (8)	7.05 <i>d</i> (8)	6.61 <i>d</i> (8)
3(5)c		6.59 <i>d</i> (8)	6.74 <i>d</i> (8)	6.58 <i>d</i> (8)	6.78 <i>d</i> (8)	6.64 <i>d</i> (8)
7c		5.21 <i>d</i> (4)	6.87 <i>d</i> (16)	5.04 <i>d</i> (4)	4.91 <i>d</i> (8)	5.11 <i>d</i> (2)
8c		3.37 <i>dd</i> (6;4)	6.58 <i>d</i> (16)	3.28 <i>dd</i> (6;4)	4.62 <i>d</i> (8)	4.31 <i>d</i> (2)
10c						
12c		5.99 <i>d</i> (2)	6.32 <i>d</i> (2)	5.99 <i>d</i> (2)	6.25 <i>d</i> (2)	6.18 <i>d</i> (2)
14c		6.43 <i>d</i> (2)	6.65 <i>brs</i>	6.41 <i>d</i> (2)		6.05 <i>d</i> (2)
					6.72 <i>brs</i>	
2(6)d		7.10 <i>d</i> (8)		7.07 <i>d</i> (8)		7.00 <i>d</i> (8)
3(5)d		6.78 <i>d</i> (8)		6.76 <i>d</i> (8)		6.71 <i>d</i> (8)
7d		5.17 <i>d</i> (11)		5.14 <i>d</i> (11)		6.87 <i>d</i> (16)
8d		3.20 <i>dd</i> (11;6)		3.09 <i>dd</i> (11;6)		6.63 <i>d</i> (16)
10d		5.81 <i>d</i> (2)		5.79 <i>d</i> (2)		
12d		6.09 <i>d</i> (2)		6.08 <i>t</i> (2)		6.34 <i>d</i> (2)
14d		5.81 <i>d</i> (2)		5.79 <i>d</i> (2)		6.67 <i>d</i> (2)
Glucose						
1'-1''	4.94 <i>d</i> (7)					
2'-2''	3.36-3.56					
3'-3''	3.36-3.56					
4'-4''	3.36-3.56					
5'-5''	3.36-3.56					
6'-6''	3.94 <i>dd</i> (12;2)					
	3.70 <i>dd</i> (12;6)					

\*methanol- $d_4$ ; \*\*acetone- $d_6$ .

1 : resvératrol diglucoside ; 2 : carexinol A ; 3 : (*E*)-miyabénol C ; 4 : kobophénol A ; 5 : (+)- $\alpha$ -viniférine ; 6 : (*E*)-miyabénol A.

**Tableau 13.** Données de la RMN  $^{13}\text{C}$  des stilbènes identifiés chez les *Carex* à 300 K.

C	1*	2**	3**	4**	5**	6**
1a	128.2	136.3	133.0	135.0	131.3	132.6
2a	129.4	112.5	127.4	126.3	127.7	128.3
3a	115.7	146.0	116.2	115.9	115.6	115.9
4a		145.5	158.1	157.6	158.4	157.9
5a	115.7	116.3	116.2	115.9	115.6	115.9
6a	129.4	117.0	127.4	126.3	127.7	128.3
7a	129.6	92.9	94.4	92.1	89.7	95.1
8a	125.5	58.2	57.0	57.8	52.5	56.1
9a	140.6	147.9	147.3	147.3	147.0	147.3
10a	108.8	106.8	106.8	106.2	120.9	107.0
11a	157.7	159.9	160.8	159.0	159.0	159.8
12a	104.1	102.0	102.0	101.5	96.2	102.4
13a	157.5	159.9	160.8	159.0	157.0	159.8
14a	108.8	106.8	106.8	106.2	105.1	107.0
1b		133.7	133.0	133.1	131.5	132.9
2(6)b		127.4	127.1	126.7	127.8	127.9
3(5)b		116.0	115.3	115.4	115.2	115.7
4b		157.4	157.2	156.9	157.1	157.9
7b		93.6	92.0	93.0	86.1	92.5
8b		52.4	50.9	52.0	46.2	49.9
9b		144.7	142.6	148.0	139.9	142.8
10b		120.3	120.0	119.4	118.8	119.2
11b		162.1	160.7	161.4	158.0	162.9
12b		96.1	96.0	96.2	97.2	96.7
13b		160.7	158.3	160.5	162.4	160.2
14b		108.4	107.4	107.8	108.2	124.1
1c		134.5	131.5	131.4	132.0	133.4
2(6)c		127.8	128.4	127.1	128.3	127.4
3(5)c		115.4	115.3	114.8	115.5	116.0
4c		156.0	157.2	155.6	157.5	157.9
7c		85.0	130.9	84.4	95.4	93.1
8c		52.7	122.4	52.1	55.6	51.5
9c		136.7	136.5	132.9	141.0	142.9
10c		124.4	121.0	120.0	119.7	120.0
11c		160.9	162.5	160.3	161.0	162.1
12c		95.8	96.8	95.3	96.2	96.7
13c		158.8	159.2	153.8	161.0	160.2
14c		110.6	104.1	109.9	105.8	107.2
1d		134.6		134.1		129.2
2(6)d		129.0		128.4		128.9
3(5)d		116.1		115.4		116.9
4d		157.7		157.1		158.0
7d		85.4		84.8		131.6
8d		62.1		61.8		122.5
9d		139.6		136.7		136.4
10d		109.3		108.6		120.9
11d		158.3		158.0		162.2
12d		103.4		102.9		97.1
13d		158.3		158.0		159.5
14d		109.3		108.6		104.4
Glucose						
1'-1''	101.6					
2'-2''	74.2					
3'-3''	77.2					
4'-4''	71.3					
5'-5''	77.5					
6'-6''	62.4					

\* methanol- $d_4$ ; \*\*acetone- $d_6$ .

1 : resvératrol diglucoside ; 2 : carexinol A ; 3 : (*E*)-miyabénol C ; 4 : kobophénol A ; 5 : (+)- $\alpha$ -viniférine ; 6 : (*E*)-miyabénol A.

**Tableau 14.** HMBC correspondant au carexinol A

C	HMBC	C	HMBC
1a	5a, 7a, 8a	1c	3(5)c, 7c, 8c
2a	6a, 7a	2(6)c	2(6)c, 3(5)c, 7c
3a	5a	3(5)c	2(6)c, 3(5)c
4a	2a, 6a	4c	2(6)c, 3(5)c
5a	-	7c	2(6)c, 8c
6a	2a, 7a	8c	7c, 14c, 8d
7a	2a, 6a, 8a	9c	7c, 8c, 8d
8a	7a, 10(14)a	10c	8c, 12c, 14c, 7b, 8b
9a	7a, 8a	11c	7b, 8b
10(14)a	8a, 12a, 10(14)a	12c	14c
11(13)a	10(14)a	13c	12c, 14c
12a	10(14)a	14c	8c, 12c
1b	3(5)b, 7b, 8b	1d	7d, 8d, 3(5)d
2(6)b	2(6)b, 3(5)b, 7b	2(6)d	7d, 2(6)d, 3(5)d
3(5)b	2(6)b, 3(5)b	3(5)d	2(6)d, 3(5)d
4b	2(6)b, 2(6)b	4d	2(6)d, 3(5)d
7b	2(6)b, 8b	7d	2(6)d, 8d
8b	7b, 14b	8d	7d, 10(14)d, 8c
9b	7b, 8b	9d	7d, 8d, 8c
10b	7a, 8a, 8b, 12b, 14b	10(14)d	12d
11b	7a, 8a, 12b	11(13)d	10(14)d
12b	14b	12d	10(14)d
13b	12b, 14b		
14b	8b, 12b		

### 3. Dosage des stilbénoides identifiés chez les différents *Carex*

La teneur moyenne des six stilbènes dans les différentes espèces de *Carex* sont présentés dans le **Tableau 15**. Les concentrations totales de stilbènes identifiés ont été ainsi déterminées à 3,5 mg.g<sup>-1</sup> pour *C. capillacea*, 7,6 mg.g<sup>-1</sup> pour *C. buchananii*, 2,8 mg.g<sup>-1</sup> pour *C. hirta*, 8,9 mg.g<sup>-1</sup> pour *C. glauca* et 5,0 mg.g<sup>-1</sup> pour *C. cuprina*. A partir de toutes les données présentées ci-dessus, nous pouvons affirmer que les espèces de *Carex* sont riches en stilbènes.

**Tableau 15.** Teneur moyenne des différents stilbènes dans les racines des différents espèces de *Carex* en (mg g-1)

stilbenes	<i>C.capillacea</i>	<i>C.hirta</i>	<i>C.cuprina</i>	<i>C.glauca</i>	<i>C.buchananii</i>
( <i>E</i> )-miyabénol A	3.50 ± 0.27	2.10 ± 0.05	-	-	3.9 ± 0.06
kobophénol A	-	-	2.17 ± 0.14	-	3.72 ± 0.12
Carexinol A	-	-	2.80 ± 0.14	-	-
( <i>E</i> )-miyabénol C	-	-	-	3.42 ± 0.03	-
(+)- $\alpha$ -viniférine	-	-	-	5.49 ± 0.09	-
( <i>E</i> )-resvératrol-3,5-diglucoside	-	0.70 ± 0.05	-	-	-

#### 4. Discussion

A partir d'une première analyse chromatographique, les *Carex* et plus particulièrement leurs parties souterraines sont apparus comme les espèces et les parties des plantes les plus intéressantes vis à vis de la richesse en stilbènes. Les laïches semblent contenir plus de stilbènes que d'autres genres de Cypéracées (*Cyperus*, *Pycerus*, *Schoenoplectus*).

Le profil assez simple des chromatogrammes des parties souterraines des *Carex* a permis de réaliser des purifications avec CLHP préparative et donc d'avoir une bonne séparation et des composés purs. L'obtention des produits purs avec des quantités suffisantes de l'ordre du mg nous a permis en premier temps de réaliser des analyses RMN et donc de faire une carte d'identification de tous les stilbénoides qu'on a pu isoler à partir des différents *Carex*.

Les données chromatographiques (nombre de taches par CCM et temps de rétention par CLHP analytique), les valeurs  $m/z$  obtenues par spectrométrie de Masse et l'utilisation de la RMN ont permis d'identifier les différents stilbènes que nous avons purifiés par CLHP préparative et semi préparative.

Nous avons obtenu 14 mg de (*E*)-miyabénol A et 21 mg de kobophénol A à partir des racines de *Carex buechananii*, 4 mg de (*E*)-miyabénol C et 14 mg d' $\alpha$ -vinéferine à partir des racines de *Carex glauca*, ces 4 composés sont identifiés comme des stilbènes connus chez d'autres espèces de *Carex*. Le (*E*)-miyabénol A a été isolé en tant que constituant de *Carex fedia* (Suzuki *et al.*, 1987). Le kobophénol A a été isolé à partir de *Carex kobomugi* (Kawabata *et al.*, 1989 ; Kurihara *et al.*, 1990 et 1991), le (*E*)-miyabénol C a été récemment identifié dans *Carex folliculata* (Li *et al.*, 2009 ; Gonzalez-Sarrias *et al.*, 2011) et enfin l' $\alpha$ -vinéferine a déjà été purifiée à partir de racines de *Carex humilis* (Lee *et al.*, 1998).

Nous avons obtenu 11,5 mg de resvératrol diglucosylé à partir des racines de *Carex hirta*, le spectre par HPLC-ESI-MS en mode positif a montré un ion à  $m/z$  : 553 correspondant à la formule  $C_{26}H_{32}O_{13}$ . Les données de la RMN ont montré des signaux caractéristiques d'une structure de resvératrol (**Figure 52 et Tableaux 12 et 13**). En effet l'ensemble de résonance  $\delta$  entre 6,7 et 7,4 ppm, composé de trois protons aliphatiques et sept protons aromatiques, est typique pour le resvératrol. L'ensemble de résonance  $\delta$  entre 3,7 et 4,0 ppm a été attribué à deux unités  $\beta$ -glycosyl liés à un cycle aromatique. Les signaux des deux unités

de glycosyle se chevauchant ont indiqué qu'ils étaient sur des positions symétriques. Enfin, les données de spectrométrie de masse et de RMN ont indiqué que ce composé est le (*E*)-resvératrol-3,5-O- $\beta$ -diglucoside précédemment identifié chez *Vitis vinifera* dans des cultures cellulaires en suspension (Larronde *et al.*, 2005). C'est la première fois que cette molécule est identifiée chez la famille des Cypéracées.

Nous avons obtenu 25,3 mg de carexinol A à partir des racines de *Carex cuprina*, l'identification de ce composé a été faite par une étude des signaux de spectre de  $^{13}\text{C}$  et une analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC (**Figure 55, 56 et 57 et tableau 12, 13 et 14**). Les RMN du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$  sont en accord avec un type de tétramère de resvératrol. Ces données montrent la présence de trois groupes de 4-hydroxyphényl (B1, C1 et D1)), deux groupes de 3,5-dioxyphényl (A2 et D2), un groupe de 3,4-dihydroxyphényl (A1), deux séquences de protons H-dihydrobenzofurane (7a / H-8a, 7b-H / H-8b) et un système de tétrahydrofurane (H-8c / H-7c / H-7j / H-8d).

La configuration stéréochimique de ce composé a été déterminée à partir de l'expérience ROESY, la présence de NOE entre H-7a / H-10(14) et H-8a / H-2 (6) indique un système *trans* de dihydrobenzofurane pour l'unité A. De même, l'existence d'un NOE entre H-7b / H-14b et H-8b / H-2 (6)b montre une relation similaire pour le système dihydrobenzofurane de l'unité B. L'existence de NOEs entre H-7c / H-8c, H-7c / H-8d et H-8c / H-8d indique la stéréochimie relative de système de tétrahydrofurane. Des NOEs croisés entre H-8a, H-8b et H-8c montrent la proximité spatiale de ces protons. Ces résultats indiquent la stéréochimie relative à celle représentée sur la figure 57. Tenant compte des spectres RMN et des données LC-Masse, nous avons conclu que ce composé est un tout nouveau oligomère de resvératrol encore inconnu. Nous avons choisi de l'appeler carexinol A.

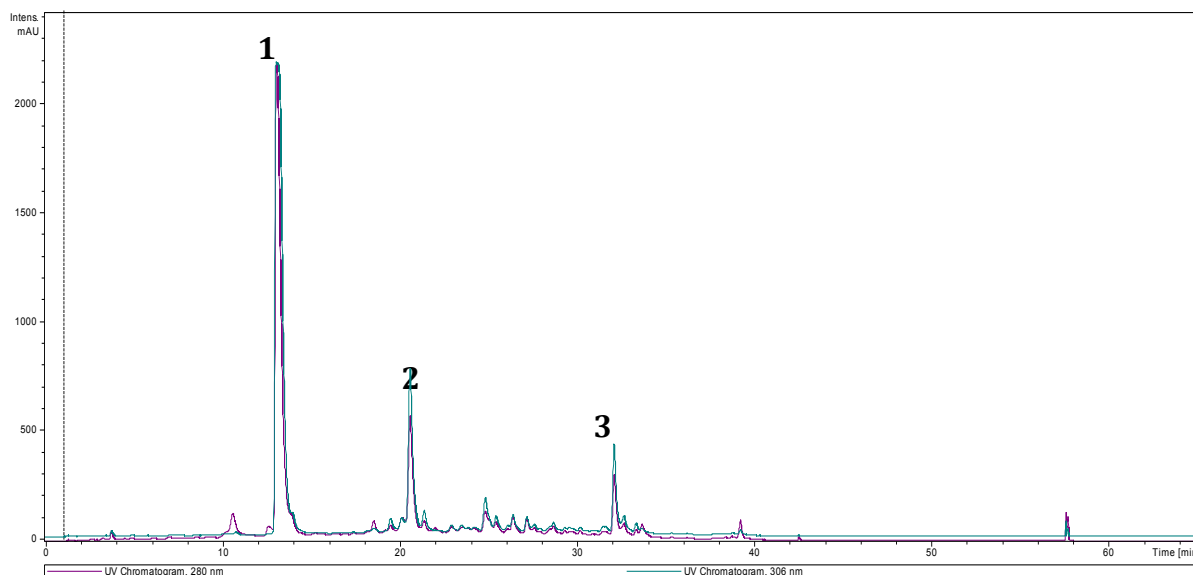
## 5. Purification par Chromatographie de Partage Centrifuge

Afin de purifier de plus grandes quantités de molécules que nous n'avons pas pu obtenir par CLHP préparative comme auparavant, nous avons utilisé cette technique de chromatographie de partage centrifuge. Nous avons travaillé à partir de matériel végétal que nous avons disponible en grande quantité : semences de *Cyperus eragrostis* et racines de *Carex arenaria*. Il a fallu à chaque fois d'abord choisir et mettre au point le système de

solvants pour obtenir une séparation optimale des composés avant de se lancer sur la séparation proprement dite avec les chromatographes Kromaton de 200 mL et de 1 L.

### 5.1. *Cyperus eragrostis*

Une première analyse des semences de *Cyperus eragrostis* en CLHP analytique (**figure 64**) et en CL-SM, a montré trois pics majoritaires avec des intensités importantes et selon le spectre UV ces trois pics peuvent correspondre à trois stilbénoides. Les données de la CL-SM ont permis de déterminer trois masses qui peuvent correspondre à deux trimères et un dimère de stilbènes (**Tableau 15**).



**Figure 64.** Chromatogramme CLHP à 306 nm des akènes de *Cyperus eragrostis*

**Tableau 16.** Données CLHP et LC-Masse de *Cyperus eragrostis* (akènes)

Pic n°	$t_r$ (min)	$m/z$ (M+H) <sup>+</sup>	Hypothèses
1	22.0	729	cyperusphénol B
2	25.6	487	scirpusine B
3	32.0	713	cyperusphénol A

Après avoir testé plusieurs systèmes de solvants par la méthode des mini-ampoules à décanter, on a utilisé le système ARIZONA-K adapté aux échantillons concernés (Foucault et Chevolot, 1998). Nous avons utilisé ce système en mode descendant.

Les deux phases inférieures et supérieures du système K ont été préparées puis séparées en ampoule à décanter. Au moins 1 L de chaque phase a été obtenue. 2 g de l'extrait des semences de *Cyperus eragrostis* ont été dissous dans 15 mL d'un mélange v/v des deux phases. Cet extrait a ensuite été injecté dans la colonne équilibrée contenant le système K à une rotation de 1000 rpm. Le débit d'élution était de 5 mL.min<sup>-1</sup> et le gradient a été réalisé sur 120mn. Le volume mort fut de 80 mL, le temps correspondant au volume mort fut de 16 min. L'élution par la phase mobile légère fut arrêtée par le déclenchement de l'extrusion à 92min à partir du tube 47 avec la phase lourde.

67 tubes ont été collectés avec un débit de 5 mL.min<sup>-1</sup> avec 2 min/tube.

On a pris 100 µL de chaque tube qui ont été évaporés a sec, on a ajouté 300 µL de méthanol à chaque tube puis on a fait une CCM, avec des dépôts de 20 µL. Selon la CCM on a ainsi regroupé les tubes en 9 fractions (**Figure 65**).

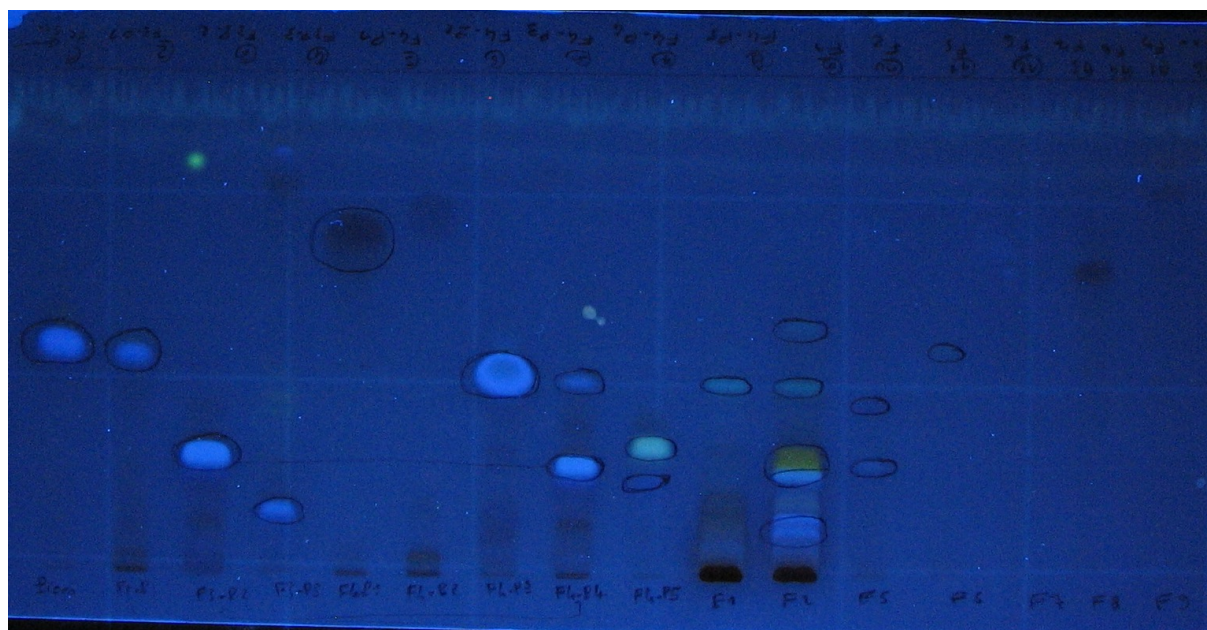
On a dilué le reste des extraits dans les pots ayant servis à la CCM 300 µL d'eau puis on a analysé tous les contenus des tubes en CLHP analytique. Ceci nous a permis de confirmer notre choix des 9 fractions.

Les analyses en CCM et CLHP-analytique ont montré que les fractions F3, F4 et F5 étaient les plus riches en stilbènes. Pour chaque fraction, on a injecté en CLHP préparative 20 mg dissous dans 400 µL de MeOH 50% avec le même gradient et les mêmes solvants qu'en CLHP analytique sauf que le débit qui est passé à 18 mL.min<sup>-1</sup>.

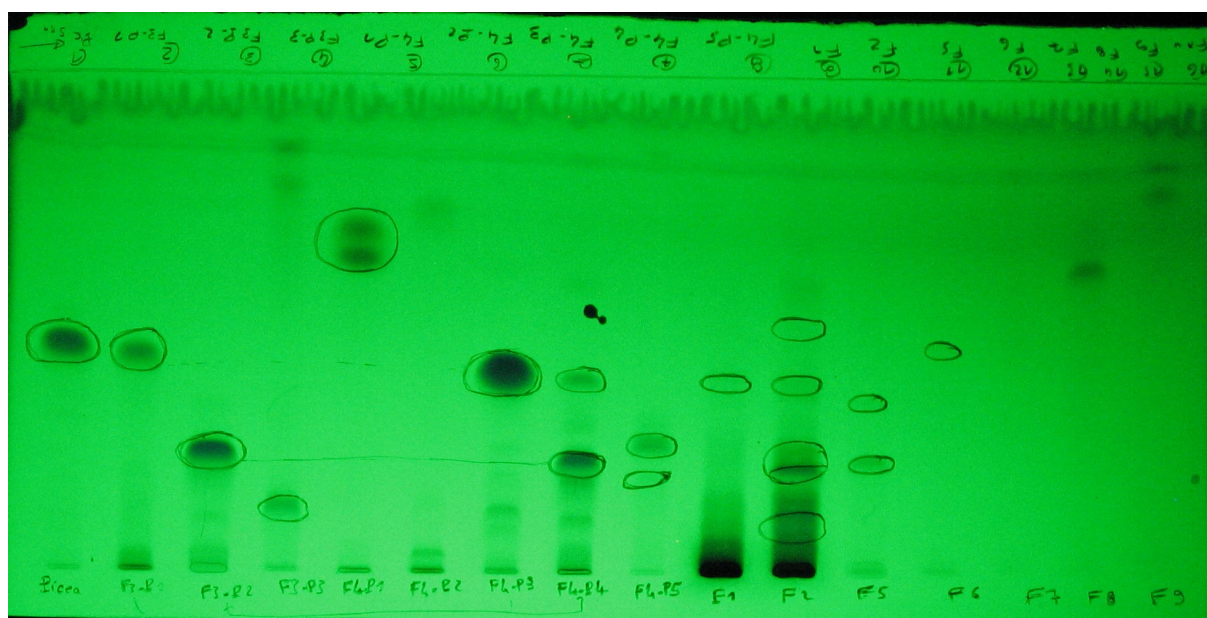
Pour F3, 3 pics ont été purifiés (pic 1 à 22,5min ; pic 2 à 25,2min et pic 3 à 28,7min). Ces trois pics ont été concentrés puis lyophilisés. Seul le pic 2 a permis d'obtenir un produit pur (3 mg). On a ensuite passé ce pic en CLHP-DAD et en CL-SM. Ce composé donne un pic principal de masse 487,0 et pourrait être de la scirpusine.

Pour F4, 5 pics ont été purifiés (pic 1 à 16,0min ; pic2 à 21,1min ; pic3 à 22.4min ; pic4 à 24.6min et pic5 à 26,6min) Ces 5 pics ont été concentrés puis lyophilisés. Seul le pic 3 a donné un produit pur (90 mg). L'analyse de ce composé correspond au pic 3 par CL-SM et donne un pic principal à 729,0 µna, il pourrait s'agir du cyperusphénol B.

Remarque : ces molécules nous serviront lors de nos analyses d'activités biologiques.



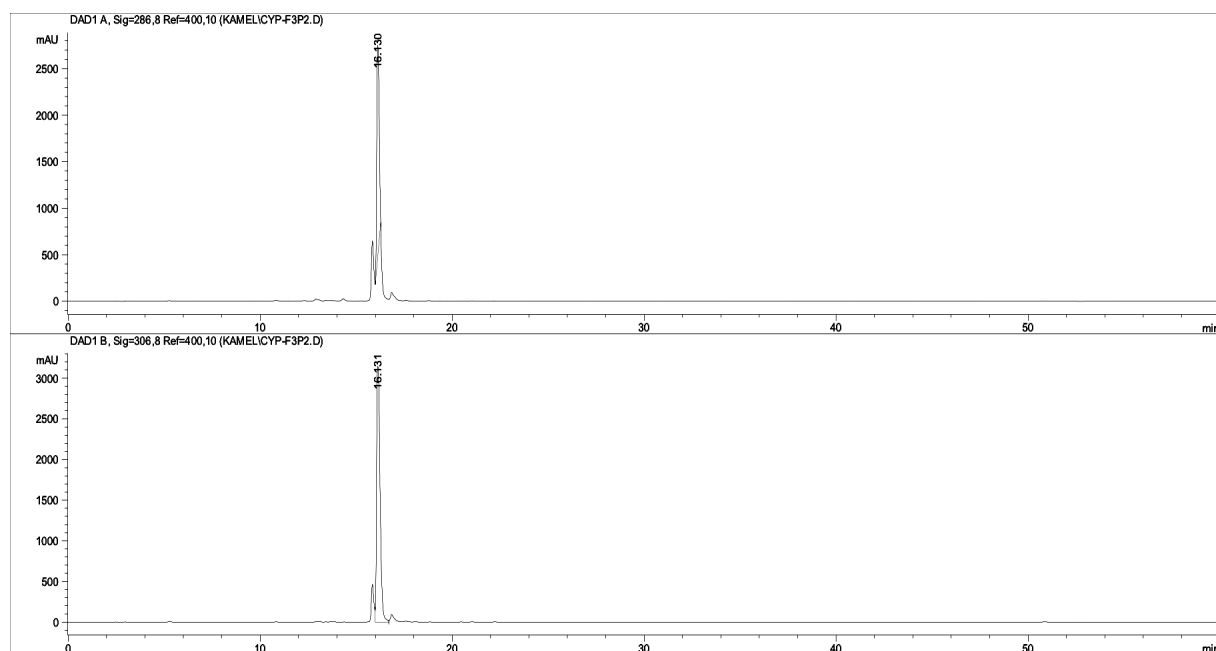
366 nm



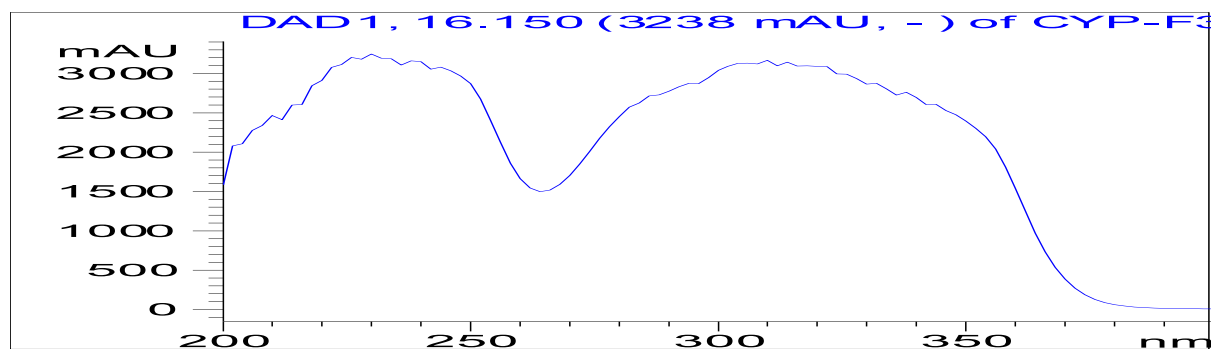
254 nm

**Figure 65.** Screening des fractions de CPC de *Cyperus eragrostis* par CCM.





**Figure 66.** Chromatogramme CLHP-DAD à 286 et 306 nm des akènes de *Cyperus eragrostis* du pic 2 de la fraction F3.



**Figure 67.** Spectre UV correspond au pic 2 de la fraction F3 pour *Cyperus eragrostis*.

## 5.2. *Carex arenaria*

Pour les racines de cette plante nous avons repris les mêmes méthodes d'analyse et de fractionnement par CPC utilisées pour *Cyperus eragrostis*. Les fractions obtenues par CPC et qui correspondent aux différents tubes récupérés après une purification par CPC sont notées dans le **tableau 17**.

**Tableau 17.** Fractions obtenues par CPC des racines de *Carex arenaria* et les masses correspondant à chaque pic de chaque fraction. (Légende : CPS  $^1\text{H}$  : Confirmé Par Spectre de proton ( $^1\text{H}$ ) ; NC : Non Confirmé).

Fractions après CPC	$t_r$ (min)	$m/z$ $[\text{M}+\text{H}]^+$	Hypothèse	RMN
<b>F1</b> (4 mg)	20.9	229	resvératrol	CPS $^1\text{H}$
	14.6	245	picéatannol	CPS $^1\text{H}$
	18.3	455	$\epsilon$ -viniférine	CPS $^1\text{H}$
	26.2	711	trimère de resv+2OH	NC
	27.4	925	kobophénol A	CPS $^1\text{H}$
	28.7	697	trimère de resv+OH	NC
	32.3	681	Miyabénol C	CPS $^1\text{H}$
	33	843	trimère + glucose	NC
<b>F2</b> (17 mg)	20.7	229	resvératrol	CPS $^1\text{H}$
	30.9	455	$\epsilon$ -viniférine	CPS $^1\text{H}$
	36.5	843	trimère + glucose	NC
<b>F6</b> (103mg)	20.2	229	resvératrol	CPS $^1\text{H}$
	14.6	245	picéatannol	CPS $^1\text{H}$
	18.3	455	$\epsilon$ -viniférine	CPS $^1\text{H}$
	26.1	713	Cypérusphénol A	CPS $^1\text{H}$
	27.4	925	Kobophénol A	CPS $^1\text{H}$
	28.7	697	Trimère+OH	NC
	32.1	681	Miyabénol C	CPS $^1\text{H}$
	36.3	843	Trimère	NC

Au regard des résultats obtenus, trois fractions (F1, F2 et F6) sont intéressantes. Ces fractions ont été travaillées plus en profondeur, une CLHP préparative a été faite pour purifier

chaque composé. Une fois les molécules sont purifiées, une identification par RMN a été réalisée. Dans un premier temps un spectre de proton pour chaque'un des composé. Par comparaison aux autres composés que nous l'avons déjà identifiés chez autre *carex* et aux donnée de la littérature ainsi que des composés qui sont déjà identifiés au laboratoire, l'extrait des racines de *Carex arenarea* montre le présence des monomères, des trimères et des tatramères de stilbènes. La fraction F6 de la CPC c'est la plus riche en stilbènes

## Chapitre 2. Stilbénoides dans des vins tunisiens

### 1. Les vin étudiés

Dans ce chapitre, notre but était d'analyser quelques vins Tunisiens pour évaluer leurs teneurs en stilbènes et tenter de trouver certaines des molécules que nous avons isolées précédemment dans les Cypéracées. Nous avons pu nous procurer 7 vins de domaines différents (Sidi Zahia, Clipea grand cru, Mornag, Sidi Rais, Destinto magnifique Sidi Salem, Sidi Brahim et Selian Sidi salem). Ces vins sont de deux appellations : appellation d'origine Mornag contrôlé et appellation d'origine contrôlé Mornag Grand Cru.

### 2. Prépurification sur résine XAD16

Dans une première étape pour éliminer différentes molécules parasites et se débarrasser d'une partie des anthocyanes et des pronthocyanidines, les différents vins sont évaporés et purifiés sur une colonne XAD 16 (5,1 de diamètre et 35 cm de hauteur) (**Tableau 18**).

**Tableau 18.** Quantités de poudres récupérées après une étape de pré purification sur colonne XAD16.

Echantillons	Volume de Vin évaporé en mL	Quantités de poudre après XAD16 en g
Vin Mornag	750	2,8
Vin Sidi Rais	500	2,5
Vin Selian magnifique	500	2,2
Vin Destinto	500	3,2
Vin Sidi Brahim	500	2,0
Vin Clipea	500	1,94
Vin Sidi Zahia	750	3,1

### 3. Prépurification sur résine Dowex

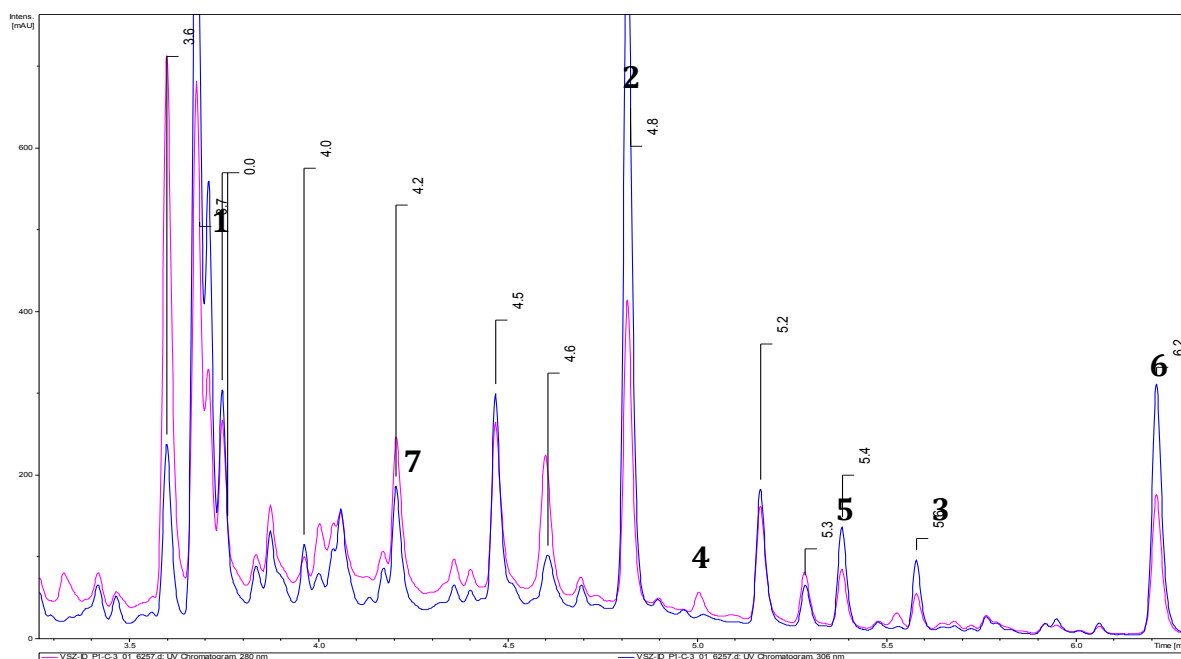
Une deuxième étape de prépurification des vins a été réalisée sur colonne Dowex après la première prépurification sur XAD16 (**Tableau 19**)

**Tableau 19.** Quantités de poudres récupérées après une étape de pré purification sur colonne Dowex.

Echantillons (déjà passé sur XAD16)	Quantités de poudre passée sur Dowex en mg	Quantités de poudre récupérée après Dowex en mg
Vin Mornag	50	8
Vin Sidi Rais	50	5
Vin Selian magnifique	10	0,8
Vin Destinto	10	1,1
Vin Sidi Brahim	10	0,7
Vin Clipea	10	1,1
Vin Sidi Zahia	10	1,2

#### 4. Analyse par CLHP analytique et UPLC-Masse

3 mg d'extrait de chaque vin est dissout dans 1 mL de MeOH 50 % et une injection de 20  $\mu$ L en CLHP analytique (**Figure 68**) et en UPLC-Masse nous a permis de déterminer les poids moléculaire correspondant au différents pics. L'identification de chaque composé a été obtenue par comparaison avec des molécules-témoin pures qui ont été isolées auparavant dans le laboratoire (**Tableau 20**).

**Figure 68.** Exemple d'un chromatogramme UPLC-DAD à 306 et 286 nm pour le Vin Sidi Zahia

**Tableau 20.** Les différents stilbènes identifiés dans les vins

Silbènes	Pic n°	$m/z$ [M+H] <sup>-</sup>	$m/z$ : [M+H] <sup>+</sup>
( <i>E</i> )-picéïde	1	389	391
( <i>E</i> )-resvératrol	2	226	228
$\epsilon$ -viniférine	3	453	455
$\alpha$ -viniférine	4	677	679
hopéaphénol	5	905	907
isopéaphénol	6	905	907
piceatanol	7	242	244

Grâce aux données de l'UPLC-Masse et les composés témoins, nous avons cherché la présence des ces différentes molécules dans les différents vins (**Tableau 21**).

**Tableau 21.** Détermination de la présence (+) ou l'absence (-) des stilbènes dans les vins

Vin	picéïde	resvératrol	picéatanol	$\epsilon$ -viniférine	$\alpha$ -viniférine	hopéaphénol	isopéaphénol
Sidi Zahia	+	+	+	+	+	+	+
Sidi Rais	+	-	-	-	+	+	+
Mornag	+	-	-	-	-	-	+
Selian	-	-	-	-	-	-	+
Distinto	-	-	-	+	-	+	-
Sidi Brahim	+	-	+	-	-	+	+
Clipea	+	-	-	+	-	+	+

## 5. Dosage des stilbènes présents dans les différents vin analysés

La quantification a été réalisée par analyse par CLHP-DAD : 3 mL de chaque vin sont passés sur colonne Dowex (10 mL). Après lavage avec un volume de 35 mL d'eau, on a ajouté 15 mL de MeOH (75 %). Les extraits récupérés sont évaporés à sec puis à chaque échantillon on a ajouté 400  $\mu$ L de MeOH (50 %). On a fait une CLHP analytique avec injection de 20  $\mu$ L de chaque échantillon. La calibration a été réalisée par injections de solutions des 7 composés à différentes concentrations. Les résultats des dosages sont donnés dans le **tableau 21**

**Tableau 21.** Quantification des stilbènes dans les vins tunisiens

Vin	piceïde (mg.L <sup>-1</sup> )	resvératrol (mg.L <sup>-1</sup> )	piceatanol (mg.L <sup>-1</sup> )	ε-viniférine (mg.L <sup>-1</sup> )	α-viniférine (mg.L <sup>-1</sup> )	hopéaphénol (mg.L <sup>-1</sup> )	isopéaphénol (mg.L <sup>-1</sup> )
Sidi Zahia	0,3	0,3	0,3	0,1	7,4	0,2	2,9
Sidi Rais	0,08	0,09	0,1	-	8,6	-	2,2
Mornag	0,2	0,1	0,7	-	8,2	-	2,9
Selian	0,08	0,02	0,2	-	2,6	0,2	0,2
Distinto	0,1	0,09	0,7	-	2,0	-	1,8
Sidi Brahim	0,09	0,09	0,2	-	3,8	-	1,1
Clipea	0,09	0,09	0,1	-	6,8	-	1,5

Nous pouvons constater que, de tous les vins étudiés, seul le vin Sidi Zahia contient les 7 stilbènes recherchés en quantité mesurable. L'ε-viniférine ne se retrouve que dans ce vin et nulle part ailleurs. Pour l'hopéaphénol, seul un autre vin, le Selian, fait jeu égal avec le Sidi Zahia.

Ces résultats montre la présence de l'isohopéaphénol dans tous les vins analysés, Ce stilbène est un tétramère de formule brute C<sub>56</sub>H<sub>42</sub>O<sub>12</sub> et de poids moléculaire 906,93. Il est présent dans les racines de *Vitis amurensis*, dans les feuilles et la tige de *Vitis vinifera*.

Concernant les stilbènes que nous avons isolés de nos Cypéracées, nous n'avons pas pu déceler la présence des miyabénols, du kobophénol A, du resvératrol diglucosylé ni du carexinol A dans les vins que nous avons étudiés.

## Chapitre 3. Evaluation des propriétés biologiques *in vitro* des stilbènes isolés.

### 1. Capacité antioxydante des stilbènes d'intérêt évaluée par 3 méthodes différentes : ORAC, DPPH et MCA

Le potentiel antioxydant de différents composés peut être mesuré par de nombreux essais *in vitro*. Chaque essai est basé sur une caractéristique de l'antioxydant, comme sa capacité à piéger des radicaux libres ou encore à inhiber la peroxydation lipidique. Cependant, l'utilisation d'une seule méthode n'est pas recommandée pour l'évaluation des activités antioxydantes de différents produits végétaux, de par leur structure complexe. De ce fait, les effets antioxydants des stilbénoides identifiés et purifiés dans la partie Phytochimie ont été évalués par 3 méthodes différentes. Nous avons mesuré la capacité antiradicalaire (capacité à fixer des radicaux libres), des molécules par les méthodes ORAC (mesure du transfert des atomes d'hydrogène), DPPH (mesure du transfert d'électrons essentiellement) et MCA (mesure de la capacité chélatrice d'ions ferreux avec la ferrozine).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante et antiradicalaire d'un composé, les résultats sont souvent exprimés et comparés par rapport à un composé de référence comme l'acide ascorbique (vitamine C) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylique, analogue hydrosoluble synthétique de la vitamine E) (Molyneux., 2004).

#### 1.1. Méthode ORAC

Ce test est réalisé en spectrofluorimétrie, il consiste à une mesure de la protection exercée par une molécule donnée contre l'oxydation de la fluorescéine par un radical libre stable, l'APPH. Les résultats sont exprimés en équivalent Trolox ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$  ou  $\mu\text{mol.mol}^{-1}$  de composé).

Six composés déjà purifiés à partir de différents *Carex* ont été ainsi testés dans cette partie (**Tableau 22**). Le resvératrol a été pris comme témoin, il présente en tant que stilbène une activité antioxydante significative.



**Tableau 22.** Résultats des activités antioxydantes par la méthode ORAC.

Composés testés	Trolox ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) de produit pur	Trolox ( $\mu\text{mol.mol}^{-1}$ ) de produit pur
Resvératrol (témoin)	30000	131,58
Resvératrol diglucosylé	20192	36,58
Miyabénol C	17367	25,54
$\alpha$ -viniférine	6345	35,65
Miyabénol A	15408	17,01
Kobophénol A	14395	15,58
Carexinol A	17851	18,99

Parmi les composés testés, le carexinol A, le miyabénol C et le resvératrol diglucosylé représentent les trois composés les plus actifs si on exprime leur activité en équivalent Trolox  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  de produit (17367, 17851 et 20192 respectivement). Le Kobophénol A et le Miyabénol A possèdent des activités intermédiaires avec 14395 et 15408 eq. Trolox( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) de produit pur, respectivement. La molécule la moins active est l' $\alpha$ -viniférine (6345 eq. Trolox ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ )). Par comparaison au resvératrol (témoin), lors de cette mesure, toutes les molécules testées ont une capacité antioxydante plus faible.

En tenant compte du poids moléculaire de chaque composé, on obtient l'ordre décroissant suivant pour l'activité antioxydante (exprimée en Trolox  $\mu\text{mol.mol}^{-1}$  de stilbène pur) : Resvératrol > Resvératrol diglucosylé > l' $\alpha$ -viniférine > Miyabénol C > Carexinol A > Miyabénol A > Kobophénol A.

Pour ce test ORAC, le resvératrol diglucosylé présente une forte activité par rapport aux autres produits testés que nous avons isolés de nos plantes. A la lumière de ces résultats, il semble que plus une molécule a un haut poids moléculaire et est complexe par son degré d'oligomérisation, plus elle a une activité antioxydante faible.

## 1.2. Méthode DPPH

Neuf stilbènes ont pu être testés dans cette partie pour évaluer leurs activités antiradicalaires par la méthode DPPH. Cette méthode est considérée comme simple, rapide et

facile à mettre en œuvre. Nous avons choisi de tester ces composés à la concentration de 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (**Tableau 23**). La quercétine a été utilisée comme polyphénol témoin antiradicalaire. A la lecture des résultats de ce test *in vitro*, quatre composés présentent une activité importante. Le carexinol A et le cypérusphénol B ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 50 % et ont une activité supérieure à celle de la quercétine témoin. Le cypérusphénol A et la scirpusine B ont un pourcentage d'inhibition supérieur à 30%. Des résultats similaires aux nôtres ont été trouvés à cette même concentration de 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  pour les cypérusphénol A et B et la scirpusine B (Ito *et al.*, 2012).

**Tableau 23.** Résultats des activités antiradicalaires par la méthode DPPH.

Composés testés à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Inhibition (%)
Quercétine (témoin)	41
Carexinol A	53
Cypérusphénol B	56
Scirpusine B	38
Cypérusphénol A	30
Resvératrol diglucosylé	12
Kobophénol A	6
Miyabénol A	4
Miyabénol C	3
$\alpha$ -viniférine	2

Ces deux tests, DPPH et ORAC, étant des essais quantitatifs, nous ont permis de comparer certains stilbènes isolés des Cypéracées entre eux selon leur capacité à piéger des radicaux libres ( $\text{APPH}^{\cdot}$  et  $\text{DPPH}^{\cdot}$ ). Les résultats montrent que ces activités varient d'un composé à un autre et selon le test effectué. Il n'y aurait donc pas pour ces molécules-là corrélation entre ces deux méthodes de dosage. En effet, avec le test DPPH, un tétramère, le carexinol A, montre une activité importante et deux trimères, le cypérusphénol B et la scirpusine B, sont un peu moins actifs. Par contre, pour l'ORAC, c'est un monomère, le resvératrol diglucosylé, qui a la plus forte activité.

Des études sur la relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piègeur des radicaux libres ont montré que l'activité anti-radicalaire est dépendante du nombre, de la position et de la nature des substituants tels que les groupements hydroxyles, méthoxyles, glycosyles et le degré de polymérisation (Tabart *et al.*, 2009 ; Karamac *et al.*, 2005). La structure chimique et la polarité de l'antioxydant sont déterminantes pour sa capacité à piéger les radicaux libres.

### 1.3. Chélation des ions métalliques : test MCA (Metal Chelating Activity)

Le fer est une substance essentielle à la vie par son rôle dans la fixation de l'oxygène sur les mitochondries, il entre notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant comme par exemple la catalase. Mais il est responsable de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton. Une mauvaise répartition ainsi que son excès provoque une génération de déchets toxiques tels que les radicaux libres et par conséquence favorise la mort cellulaire : on parle de mort cellulaire induite par le fer. Les chélateurs de fer ont démontré leur efficacité sur la mort cellulaire des neurones de la substance noire (Hirsch , 2012).

Le radical  $\text{HO}^\bullet$  est l'une des espèces chimiques les plus oxydantes et peut attaquer très rapidement la plupart des molécules biologiques.  $\text{HO}^\bullet$  est produit par réduction monoélectronique de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par les ions métalliques comme  $\text{Fe}^{2+}$ , libres ou complexés (réaction Fenton). De ce fait, la chélation des ions métalliques permet d'arrêter la réaction de Fenton et donc de réduire la production de  $\text{HO}^\bullet$ .



Des études menées par Leopoldini et ses collaborateurs ont mis en évidence que des polyphénols, notamment des flavonoïdes, pouvaient chélater les ions du fer. Ils ont même découverts les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques (Leopoldini *et al.*, 2006).

Pour mesurer la capacité d'un composé à chélater le Fer ( $\text{Fe}^{2+}$ ), nous avons choisi de tester neuf stilbènes qui ont déjà été identifiés dans la partie 1 Phytochimie. Nous avons

réalisé le dosage utilisant la ferrozine. La ferrozine peut se complexer de manière quantitative avec le  $\text{Fe}^{2+}$ . En présence d'autres agents chélateurs, la formation du complexe est inhibée. Le resvératrol a été utilisé comme polyphénol-témoin et quatre concentrations différentes des stilbènes d'intérêt ont été testées (2,5 ; 5 ; 10 et 25  $\mu\text{M}$ ) (**Tableau 24**).

**Tableau 24.** Tableau récapitulatif des pourcentages d'activité chélatrice du Fer de 9 stilbènes identifiés dans les Cypéracées et du resvératrol.

Molécules	Concentration ( $\mu\text{M}$ )			
	2,5	5	10	25
Carexinol A	50,79 $\pm$ 5,4	74,90 $\pm$ 12,6	82,08 $\pm$ 2,6	106,95 $\pm$ 11,2
MA	61,31 $\pm$ 0,0	75,67 $\pm$ 5,1	90,92 $\pm$ 12,5	164,64 $\pm$ 26,4
MC	51,56 $\pm$ 2,7	100,79 $\pm$ 18,2	103,36 $\pm$ 26,5	128,74 $\pm$ 32,5
KA	75,54 $\pm$ 0,5	80,54 $\pm$ 3,3	87,08 $\pm$ 14,6	154,38 $\pm$ 10,7
AV	44,90 $\pm$ 14,5	58,23 $\pm$ 13,5	80,79 $\pm$ 20,0	115,15 $\pm$ 51,4
CB	64,00 $\pm$ 13,5	73,23 $\pm$ 9,2	78,62 $\pm$ 34,2	81,69 $\pm$ 7,0
SB	39,77 $\pm$ 8,0	53,87 $\pm$ 16,5	88,23 $\pm$ 33,0	105,41 $\pm$ 39,2
CA	55,15 $\pm$ 16,5	70,03 $\pm$ 27,3	75,92 $\pm$ 26,2	91,31 $\pm$ 5,3
RD	47,46 $\pm$ 1,2	55,15 $\pm$ 0,2	66,69 $\pm$ 10,4	80,54 $\pm$ 7,1
Resvératrol	44,00 $\pm$ 3,8	64,77 $\pm$ 7,0	81,31 $\pm$ 17,4	91,31 $\pm$ 14,1

Le 100% est établi avec de l'EDTA (*cf. chapitre Matériels et Méthodes*). (MA : (*E*)-miyabénol A ; MC : (*E*)-miyabénol C ; KA : kobophénol A ; AV : (+)- $\alpha$ -viniférine ; CB : cypérusphénol B ; SB : scirpusine B ; CA : cypérusphénol A ; RD : (*E*)-resvératrol diglucosylé).

Les résultats présentés dans le Tableau 24 permettent d'observer que, quelque soit le polyphénol testé, l'absorbance du complexe ferrozine- $\text{Fe}^{2+}$  décroît linéairement en présence des composés et cela de manière dose dépendante : ainsi, plus la concentration d'un composé est élevée plus le pourcentage d'activité chélatrice du Fer augmente. Afin de pouvoir comparer le pouvoir chélateur de chaque composé, nous avons déterminé leur  $\text{CI}_{50}$ , soit la capacité chélatrice des stilbènes à chélater 50% du fer (**Tableau 25**).

**Tableau 25.** .  $CI_{50}$  de la capacité des stilbènes à chélater le fer

Molécules	$CI_{50}$ ( $\mu$ M)	
Resvératrol	318,08	monomère
RD	460,51	"
SB	261,72	dimère
CA	506,74	trimère
AV	239,22	"
CB	407,85	"
MC	454,63	"
<b>KA</b>	<b>195,96</b>	tétramère
Carexinol A	328,82	"
<b>MA</b>	<b>182,67</b>	"

(MA : (*E*)-miyabénol A ; MC : (*E*)-miyabénol C ; KA : kobophénol A ; AV :  $\alpha$ -viniférine ; CB : cypérusphénol B ; SB : scirpusine B ; CA : cypérusphénol A ; RD : (*E*)-resvératrol diglucosylé).

Les résultats présentés dans le **tableau 25** montrent que les  $CI_{50}$  varient entre 182 et 506  $\mu$ M. Le resvératrol possède une  $CI_{50}$  de 318 selon nos expérimentations. Ainsi, par comparaison au resvératrol, 4 des stilbènes d'intérêt, le (*E*)-miyabénol A, le kobophénol A, l' $\alpha$ -viniférine et la scirpusine B présentent une  $CI_{50}$  plus faible avec des valeurs de 182,67 ; 195,96 ; 239,22 et 261,72, respectivement. Ces 4 molécules possèdent donc une activité chélatrice supérieure à celle du resvératrol. Les molécules les moins actives sont le (*E*)-miyabénol C, le (*E*)-resvératrol diglucosylé et le cypérusphénol A. Nous ne notons pas de corrélation entre la taille de la molécule (monomère à tétramère) et sa capacité plus ou moins importante à chélater le fer.

## 2. Effets de stilbènes sur la viabilité neuronale en présence de $\beta$ A

De nombreuses observations sont en faveur d'un niveau élevé de stress oxydant dans la maladie d'Alzheimer, phénomène lié à l'âge et à l'accumulation du peptide amyloïde.

Comme nous venons de le montrer, les différents stilbènes isolés et purifiés dans le chapitre 1 possèdent des propriétés antioxydantes. Nous avons donc souhaité mettre en

évidence d'éventuels effets de ces composés sur la viabilité neuronale face à la toxicité du  $\beta$ A (toxicité pouvant passer par un stress oxydant). Nous avons utilisé comme modèle d'étude des cellules neuronales (lignée PC12) mises en contact avec le peptide  $\beta$ A<sub>25-35</sub>.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de ces stilbènes sur la viabilité des cellules PC12 en absence de  $\beta$ A, afin de déterminer si ces composés seuls pouvaient induire une toxicité sur les cellules. Puis, nous avons recherché leur potentielle capacité à inhiber la mort neuronale induite par le peptide.

## 2.1. Détermination des seuils de toxicité des stilbènes sur les cellules PC12

Pour ce travail, les cellules PC12 sontensemencées dans du milieu complet à raison de 30 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les concentrations testées pour chacun des stilbènes sont 2,5 / 5 / 10 / 25 et 50  $\mu$ M. La viabilité cellulaire est mesurée après 24h de traitement.

Douze composés, majoritairement isolés et purifiés à partir des Cypéracées, ont été testés. Le **tableau 26** récapitule la concentration à laquelle nous avons observé une toxicité des composés sur les neurones (c'est à dire viabilité inférieure à 80% de celle des cellules sans composé). Nous observons que parmi les 12 composés, 4 stilbènes ne présentent pas de toxicités aux concentrations testées : le resvératrol diglucosylé + OH, la scirpusine B, le kobophénol A et le carexinol A. Quatre stilbènes sont toxiques à 50  $\mu$ M (resvératrol diglucosylé,  $\epsilon$ -viniférine, cypérusphénol A et (*E*)-miyabénol A) et 2 à 25  $\mu$ M (cypérusphénol B et (*Z*)-miyabénol A). Les molécules les plus toxiques sont 2 trimères du resvératrol : l' $\alpha$ -viniférine et le (*E*)-miyabénol C, à 5 et 10  $\mu$ M, respectivement. Ces dernières ne seront pas utilisées pour les tests cellulaires en présence de  $\beta$ A.

**Tableau 26.** Tableau récapitulatif des concentrations toxiques sur les neurones (concentrations en  $\mu\text{M}$ , ; nd : non défini ).

Stilbènes	Concentration toxique ( $\mu\text{M}$ )
Resvérol diglucosylé	50
Resvérol diglucosylé + OH	nd
$\epsilon$ -viniférine	50
Scirpusine B	nd
$\alpha$ -viniférine	5
(E)-miyabénol C	10
Cypérusphénol A	50
Cypérusphénol B	25
(Z)-miyabénol A	25
(E)-miyabénol A	50
Kobophénol A	nd
Carexinol A	nd

Ces résultats ne nous permettent pas de faire un lien entre la structure, et plus précisément l'oligomérisation, des stilbènes et leur toxicité sur des cellules neuronales en culture *in vitro*.

## 2.2. Effet des stilbènes sur la viabilité des cellules PC12 en présence de $\beta\text{A}$

Afin de tester les effets protecteurs des différents polyphénols sur les cellules PC12 vis à vis du peptide  $\beta\text{A}$ , Les cellules sontensemencées dans du milieu complet pendant 24h, puis traitées pendant 24 heures selon différents traitements:

- condition "temoin" ou les cellules sont dans du milieu complet
- condition " $\beta\text{A}$ " ou les cellules sont en présence de 10  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{A}$
- conditions " $\beta\text{A}$  + stilbènes" ou les cellules sont en présence de 10  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{A}$  et de différentes concentrations en stilbènes (2,5 / 5 / 10 / 25 et 50  $\mu\text{M}$ ).

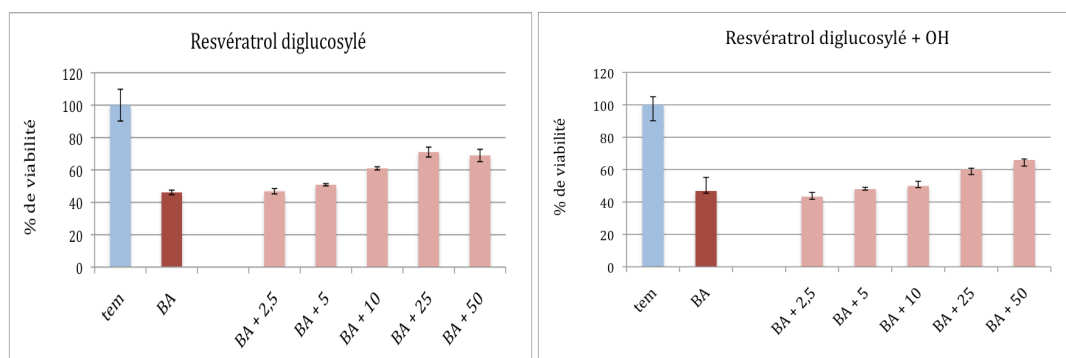
La viabilité cellulaire est ensuite mesurée par le test MTT. Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapports au témoin.

Nous observons dans les différentes expériences présentées sur les figures 69 à 71, que le peptide  $\beta\text{A}$  induit une mort cellulaire de plus de 50% par rapport aux cellules "témoin". L'effet cytoprotecteur des stilbènes, c'est à dire l'observation d'une augmentation de la

viabilité cellulaire en présence des polyphénols par rapport à la condition " $\beta$ A" est détaillé dans les paragraphes suivants.

### Les monomères

Le diglucosyle de resvératrol présente une activité très faible face à la toxicité du  $\beta$ A, puisqu'au maximum, il restaure la viabilité de 25% et ce à 25  $\mu$ M. La présence d'un groupement hydroxyle diminue son efficacité (**Figure 69**).



**Figure 69.** Pourcentages de cellules vivantes après un traitement ou non avec du  $\beta$ A et de deux monomères : resvératrol diglucosylé et resvératrol diglucosylé+OH (n=4,  $\pm$  écart-type) .

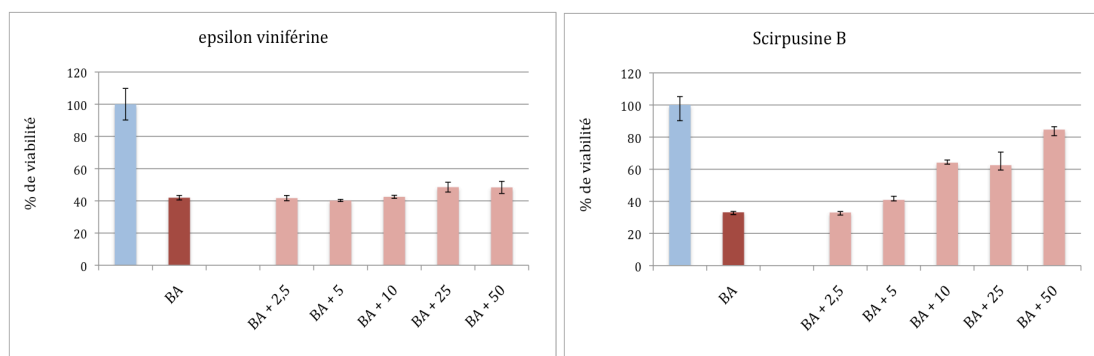
Des travaux ont été réalisés sur les activités du resvératrol sur les cellules PC12, Jang et Surh (2003) ont mis en évidence qu'un traitement de 36 heures avec 25  $\mu$ M de ce stilbène permettrait de réduire la mort cellulaire induite par le  $\beta$ A<sub>25-35</sub> de près de 30%. Par contre, Conte *et al.* (2003) ont mis en évidence qu'un co-traitement pendant 24 heures de  $\beta$ A<sub>25-35</sub> avec 25  $\mu$ M de resvératrol n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire des PC12, mais que l'efficacité du polyphénol n'est effective qu'en présence du  $\beta$ A<sub>1-41</sub>, séquence plus complète du peptide. Des travaux réalisés précédemment au GESVAB sur le resvératrol n'ont pas mis en évidence d'activité de ce composé comme dans l'étude de Conte *et al.* (2003). La présence de 2 groupements glucosyl sur cette molécule semble donc apporter une légère efficacité à la molécule.

### Les dimères

Parmi les dimères testés, l' $\epsilon$ -viniférine ne présente que peu d'intérêt puisqu'elle ne restaure la viabilité que faiblement aux concentrations maximales non toxiques, c'est-à-dire 10 et 25  $\mu$ M. Par contre, la scirpusine B présente une activité protectrice très intéressante qui



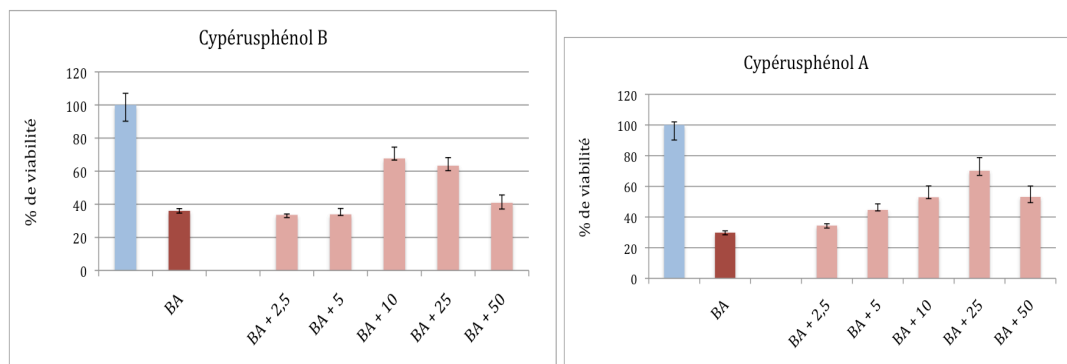
augmente avec la concentration, elle restaure la viabilité cellulaire de plus 41 % à 50  $\mu$ M (Figure 70).



**Figure 70.** Pourcentages de cellules vivantes après un traitement ou non avec du  $\beta$ A et de deux dimères : epsilon-viniférine et scirpusine B (n=4,  $\pm$  écart-type).

### Les trimères

La cypérusphénol A est toxique à 50  $\mu$ M et la cypérusphénol B à 25  $\mu$ M, cependant ces 2 composés présentent une activité protectrice de plus 21 % à 10  $\mu$ M (Figure 71).

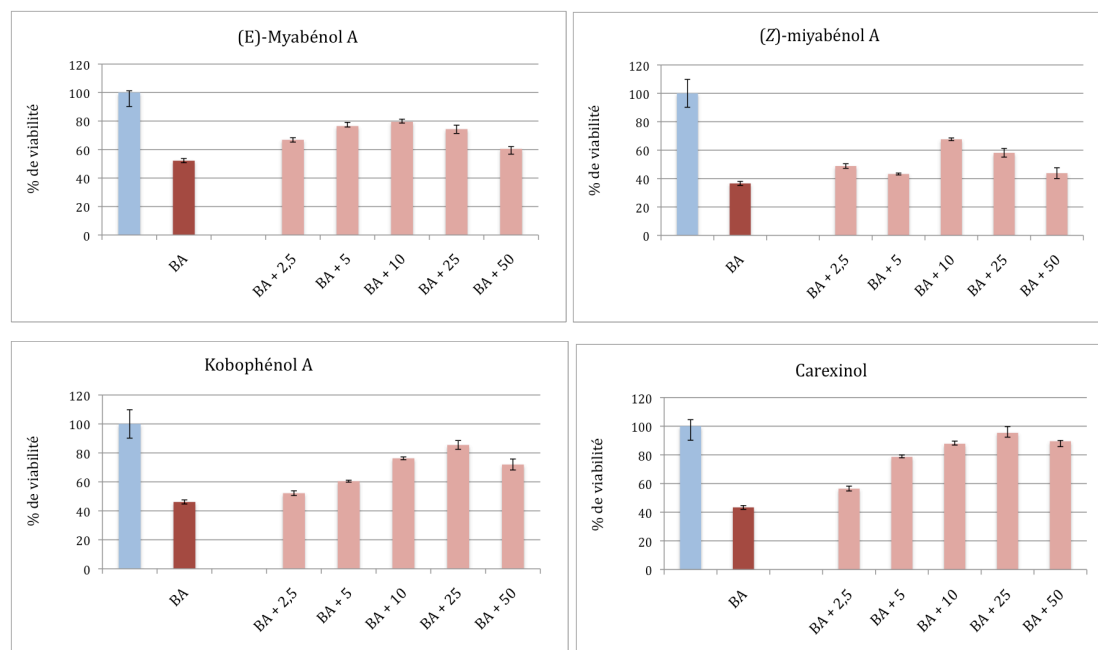


**Figure 71.** Pourcentages de cellules vivantes après un traitement ou non avec du  $\beta$ A et de deux trimères : cypérusphénol A et cypérusphénol B (n=4,  $\pm$  écart-type).

### Les tétramères

Pour les tétramères étudiés : le (*Z*)-miyabénol A et le (*E*)-miyabénol A ont une activité qui atteint 40 % à 10  $\mu$ M, mais ces composés sont toxiques respectivement à 25 et 50  $\mu$ M. Le kobophénol A et le carexinol A présentent une efficacité très importante. L'efficacité de ces composés dépend de sa concentration : plus elle augmente, plus la restauration de la viabilité est importante. Le carexinol A peut restaurer la viabilité cellulaire de 52 % à 25  $\mu$ M (Figure 72). Parmi les tétramères de resvératrol dans la littérature, seule la vitisine A a été étudiée sur

un modèle de culture de cellules de type neuronal. Les auteurs montrent que 10  $\mu\text{M}$  de cette molécule augmente de la viabilité cellulaire des cellules PC12 de 17% en présence de 20  $\mu\text{M}$  de  $\beta\text{A}$  (Jang *et al.*, 2007).



**Figure 72.** Pourcentages de cellules vivantes après un traitement ou non avec du  $\beta\text{A}$  et de quatre tétramères : (Z)- et (E)-Miyabénol A ; Kobophénol A et Carexinol A ( $n=4$ ,  $\pm$  écart-type).

Le **tableau 27** récapitule les concentrations à laquelle ces composés sont capables d'inhiber de façon plus ou moins efficace la mort cellulaire induite par le  $\beta\text{A}$ . Pour ce faire, nous avons créé une échelle arbitraire d'efficacité. Par exemple la valeur « entre 5 et 20 % » : signifie que la valeur du % de viabilité «  $\beta\text{A}$  + composé » - la valeur du % de viabilité «  $\beta\text{A}$  seul » est entre 5 et 20. En fait, plus ce % augmente pour un stilbène donné, plus ce composé est actif.

**Tableau 27.** Tableau récapitulatif des % de restauration de la viabilité des cellules

Stilbènes	Concentration de restauration ( $\mu$ M)		
	entre 5% et 20%	entre 21% et 40%	> à 41 %
Resvératrol diglucosylé	5 ; 10	25	
Resvératrol diglucosylé + OH	25 ; 50		
$\epsilon$ -viniférine	25		
Scirpusine B	5	10 ; 25	50
Cypérusphénol A	2,5 ; 5	10 ; 25	
Cypérusphénol B		10	
(Z)-miyabénol A	5	10	
(E)-miyabénol A	2,5	5 ; 10 ; 25	
Kobophénol A	2,5 ; 5	10	25
Carexinol A	2,5	5	10 ; 25 ; 50

Parmi les différents stilbènes testés, 5 stilbènes ont une activité entre 21 et 40 % : le resvératrol diglucosylé et le cypérusphénol A à la concentration de 25  $\mu$ M, ainsi que le cypérusphénol B, le (Z)-miyabénol A et le (E)-miyabénol A à 10  $\mu$ M. Deux composés ont une activité entre 5 et 20 % : l' $\epsilon$ -viniférine à 25  $\mu$ M et le resvératrol glycosylé + OH à 50  $\mu$ M.

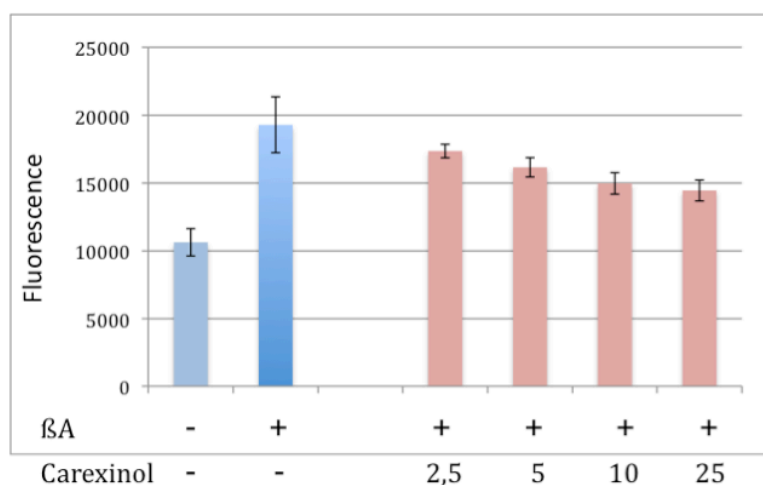
Trois composés ont un effet très important sur la viabilité des cellules PC12 : la scirpusine B, le kobophénol A et le carexinol A. Ils montrent une capacité importante à inhiber la mort neuronale induite par le peptide  $\beta$ A. Le kobophénol A et le carexinol A sont très actifs à 25  $\mu$ M, ces deux composés ont une activité supérieure à 41 %.

Par ailleurs, parmi les 12 stilbènes testés, le carexinol A est le plus actif face à la toxicité du  $\beta$ A, nous avons donc choisi d'approfondir notre étude sur les mécanismes d'action de ce composé.

### 3. Effet du carexinol A sur la production des ROS

Nous avons identifié le carexinol A pour la première fois chez les Cypéracées dans le genre *Carex* (Arraki *et al.*, 2013). Il présente donc un intérêt évident pour nos recherches, en ce qui concerne ses potentielles activités biologiques.

Afin de déterminer l'effet antioxydant du carexinol A sur un modèle cellulaire, nous avons mis en contact les cellules PC12 avec ce stilbène à différentes concentrations en présence de  $\beta$ A à 20  $\mu$ M (**Figure 73**).



**Figure 73.** Dosage de la fluorescence par DCFH<sub>2</sub>-DA sur des cellules traitées ou non avec du  $\beta$ A et du carexinol (n=4,  $\pm$  écart-type). Les cellules sontensemencées dans du milieu complet pendant 24h. Elles sont traitées pendant 6 heures avec du  $\beta$ A et du carexinol puis la présence de ROS est mesurée par DCFH<sub>2</sub>-DA.

Nous observons que plus la concentration en tétramère est élevée moins la production de ROS est importante. En effet, le  $\beta$ A augmente la production des ROS (181% vs 100% pour le témoin) et une concentration de 5  $\mu$ M de carexinol A permet de diminuer significativement la production de ROS (le pourcentage est de 152%) et 25  $\mu$ M de ce tétramère diminue le pourcentage jusqu'à une valeur de 136%.

Le carexinol A peut diminuer la quantité de ROS présents dans les cellules par différents mécanismes, en stabilisant les espèces radicalaires et ainsi limitant les phénomènes d'oxydation, mais également en activant le système de défense de la cellule face aux ROS. Ces derniers étant impliqués dans la mort neuronale, la diminution de leur production pourrait être à l'origine de la restauration de la viabilité en présence de ce polyphénol observé sur la **Figure 73**. Les mécanismes entrant en jeu restent à éclaircir, notamment en étudiant les enzymes antioxydantes intervenant dans la protection de la cellule contre les ROS.

# **Conclusions**

# **Perspectives**

### ***Principales conclusions de notre Thèse***

Lors de nos travaux, nous avons recherché des stilbènes dans de nombreuses espèces de Cypéracées, principalement des espèces du genre *Carex* (cf. **Tableau 3** dans la partie Matériel et Méthodes). Nous avons identifié plusieurs stilbènes complexes en utilisant différentes techniques telles que la CLHP-DAD, les spectrométries de Masse et de RMN couplées ou non à la CLHP. Nous avons aussi réussi à isoler certains de ces stilbènes en quantité suffisante, plus d'une vingtaine de mg, afin de réaliser des études pharmacologiques *in vitro*. Nous avons ainsi réussi à isoler une nouvelle molécule encore inconnue dans la nature, le carexinol A, dans un de nos *Carex*, *Carex cuprina*. Nous avons aussi isolé un diglucoside de resvératrol, stilbène déjà connu chez la Vigne mais nouveau dans le genre *Carex*. Nous avons aussi isolé un diglucoside de resvératrol hydroxylé encore inconnu chez les Cypéracées.

Au début de notre Thèse, nous avons tenté d'isoler des stilbènes à partir de différentes parties de plantes. Nous nous sommes rapidement aperçu que les parties aériennes étaient assez décevantes. Dans un premier temps, les chromatographies en couche mince ne montraient pas de quantités importantes de stilbènes dans les différents extraits chlorophylliens. Ceci a été confirmé par les analyses par CLHP-DAD. En effet, à prises d'essai équivalentes aux parties souterraines des plantes, les chromatogrammes CLHP des extraits des parties aériennes donnaient des signaux très faibles ainsi que des "forêts" de pics. Nous nous sommes rapidement rendus à l'évidence que ces parties aériennes chlorophylliennes étaient très difficilement exploitables pour obtenir des pics purs en quantités. Nous nous sommes donc focalisés sur les parties souterraines dont les chromatogrammes donnaient des signaux forts et des pics assez bien séparés. Ceci nous laissait espérer la possibilité d'obtenir des molécules pures en quantité importante. La purification finale des molécules fut réalisée par CLHP préparative dans la plupart des cas. Nous avons aussi utilisé la technique de CPC sur certaines plantes dont nous avons une forte biomasse. C'est par cette technique de CPC que nous avons fractionné des extraits de semences, seules parties aériennes sur les quelles nous avons pu travailler.

Ces travaux sur les stilbènes de *Carex* nous ont permis de publier un article dans un journal à comité de lecture :

Kamel Arraki, Tristan Richard, Alain Badoc, Eric Pédro, Jonathan Bisson, Pierre Waffo-Tégou, Ahmed Mahjoub, Jean-Michel Mérillon and Alain Decendit  
Isolation, Characterization and Quantification of Stilbenes from Some *Carex* Species  
*Rec. Nat. Prod.* 7:4 (2013) 281-291

Résumé de l'article :

Nous avons étudié le contenu stilbénique de cinq *Carex* jamais encore explorés : *Carex capillacea*, *Carex hirta*, *Carex buechananii*, *Carex cuprina*, *Carex glauca*. Les structures des stilbènes furent établies à l'aide de la CLHP-DAD, de la spectrométrie de Masse et de la Spectrométrie de RMN. Nous avons ainsi découvert un nouvel oligomère de stilbène, le carexinol A ainsi que cinq autres stilbènes déjà connus, le resvératrol-diglucoside, les miyabénol A et C, le kobophénol A et l' $\alpha$ -viniférine. De plus, c'est la première fois qu'un resvératrol diglucoside est trouvé chez un *Carex*. L'article est joint dans les pages suivantes.

## Isolation, Characterization and Quantification of Stilbenes from Some *Carex* Species

Kamel Arraki<sup>1,2</sup>, Tristan Richard<sup>1\*</sup>, Alain Badoc<sup>1</sup>, Eric Pédrot<sup>1</sup>,  
Jonathan Bisson<sup>1</sup>, Pierre Waffo-Téguo<sup>1</sup>, Ahmed Mahjoub<sup>1,2</sup>,  
Jean-Michel Mérillon<sup>1</sup> and Alain Decendit<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>GESVAB (EA 3675), ISVV, Université de Bordeaux 2, 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>2</sup>Faculté des Sciences de Bizerte, Zarzouna 7021, Tunisia

(Received December 11, 2012; June 18, 2013; Accepted July 9, 2013)

**Abstract:** Plants of the *Carex* genus (Family: Cyperaceae) have attracted recent attention as potential food additives due to their high levels of potential bioactive compounds. In this study, the stilbene contents of five unexplored *Carex* species were investigated: *Carex capillacea*, *Carex hirta*, *Carex buehneri*, *Carex cuprina*, *Carex glauca*. High-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC–MS) and NMR spectroscopy (NMR) were used to identify the structures. A novel stilbene oligomer, carexinol A, was isolated together with five previously known stilbenes: resveratrol-diglucoside, miyabenol A and C, kobophenol A and α-viniferin. Furthermore, this is the first report of resveratrol diglucoside in *Carex* genus.

**Keywords:** Cyperaceae; *Carex*; stilbenes; roots; Carexinol A; NMR spectroscopy.

### 1. Introduction

Stilbenes are non-flavonoid polyphenols with resveratrol as a basic sub-unit. They can be found in numerous plants distributed in several botanical families [1]. Stilbenes are constituents of vine and wine and may be involved in health benefits brought by moderate wine consumption [2]. Stilbenes are very interesting for their biological properties, such as potential antioxidative activity on human low density proteins [3], antimicrobial activity [4], inhibition of human platelet aggregation [5] and as cancer-chemopreventive natural products [6]. Complex stilbenes are present in very small amounts in vine [7]. Thus, we began the evaluation of other botanical families in order to produce large quantities of these compounds for biological studies. Studies have shown that members of the *Carex* genus produce biologically active stilbenes including resveratrol oligomers [8].

\* Corresponding authors: E-Mail: [tristan.richard@u-bordeaux2.fr](mailto:tristan.richard@u-bordeaux2.fr); Phone:(+33)557122710 Fax:(+33)557122717  
[alain.decendit@u-bordeaux2.fr](mailto:alain.decendit@u-bordeaux2.fr); Phone:(+33)557575956 Fax:(+33)557575912



In the current study, from a first screening realized among a few Cyperaceae species of the *Carex* genus five species were selected: *Carex capillacea*, *Carex buchananii*, *Carex hirta*, *Carex glauca* and *Carex cuprina*. To our best knowledge, these five *Carex* species have not been previously investigated. The focus of this study on chemical composition of the *Carex* genus is a qualitative and quantitative approach to stilbene evaluation. Six major stilbenes were identified and quantified from roots: (E)-resveratrol 3,5-O- $\beta$ -diglucoside (**1**), (E)-miyabenol C (**3**), kobophenol A (**4**), (+)- $\alpha$ -viniferin (**5**), (E)-miyabenol A (**6**), and a new molecule identified as a stilbene tetramer: carexinol A (**2**).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents and standards

The methanol and acetonitrile were obtained from Scharlab® S.L. (Sentmenat, Spain), trifluoroacetic acid (TFA) from Sigma-Aldrich® and deuterated solvents from Eurisotop. Water was purified using an Elga water purification system (Bucks, UK) with a resistivity of no less than 18 M $\Omega$ /cm.

### 2.2. Plant material

Harvests were made in the botanical garden of Talence (France) in 2011. After harvest, plants were washed thoroughly to remove earth. The different plant parts were separated: roots, stems, seeds and leaves. In this paper, only root extracts were characterized. The samples were kept in -20°C before analysis.

### 2.3. Extraction of plant samples

We used about 500 mg of frozen material for each sample. Each sample was extracted by grinding with (5 x 2) mL of methanol at room temperature. Mortar and pestle were washed with 2 mL of methanol. This extraction was renewed twice. The plant debris was extracted once more by stirring with 100 mL methanol in a 250 mL flask for 24 h in a cold room at +4 °C. After centrifugation at 750 g for 5 min, the supernatant of each extract was recovered. The methanol extracts of each sample were pooled and concentrated first with a rotary vacuum evaporator. Then the smaller obtained volume (less than 10 mL) was evaporated to dryness with a centrifugal vacuum evaporator Savant® (Farmingdale, USA) speedvac® SVC200. The dried extracts were first re-dissolved in 300  $\mu$ L methanol and then diluted with 700  $\mu$ L of distilled water by vortexing and ultrasonic. Each extract is then pre-purified on a solid phase extraction (SPE) minicolumn Supelco® (Bellefonte, USA) Supelclean® LC18 3 mL. The sample was loaded onto the mini-column and washed first with 2 mL water and then eluted twice with 2 mL 90% methanol. The recovered solution contains polyphenols (flavonoids and stilbenes). Each extract was evaporated to dryness with the same centrifugal vacuum evaporator. Before HPLC analyses, the dried extract is re-dissolved in 500  $\mu$ L HPLC grade 50% methanol by vortexing and ultrasonic and finally filtered through a Millipore® (Billerica, USA) 0.45  $\mu$ m nylon filter cartridge.

### 2.4. Stilbenes isolation

#### 2.4.1 Analytical HPLC-DAD

Analyses were carried out on an Agilent® (Santa Clara, USA) 1100 HPLC system coupled with a diode array detector (DAD). 20  $\mu$ L of each sample was injected for each chromatographic analysis.

Polyphenolic extracts were separated on a Bischoff® (Stuttgart, Germany) Prontosil® reverse-phase C18 column (5 µm packing, 4 mm i.d. × 250 mm) protected with a guard column of the same material. Solvents used for the separation were 0.1% TFA in water (A) and 0.1% TFA in acetonitrile (B). The elution program at 1 mL/min was a linear gradient of 10 to 90% of (B) in 60 min. The chromatograms were monitored at 286 and 306 nm and the spectra (200-600 nm) continuously recorded.

#### 2.4.2. Preparative HPLC

The purification was carried on a Varian® (Palo Alto, USA) HPLC system coupled with a double UV-visible wavelength detector. The solvents and the gradient were the same than in the analytical conditions. The flow was 3 mL/min with a Bischoff® Prontosil® Eurobond® reverse-phase C18 column (5 µm packing, 8 mm i.d. × 250 mm) protected with a guard column of the same material for the semi-preparative conditions. In order to enhance the production of pure compounds, the flow was 18 mL/min with a Bischoff® Ultrasep® Eurobond® reverse-phase C18 column (5 µm packing, 20 mm i.d. × 250 mm) protected with a guard column (20 mm i.d. × 50 mm) of the same material for the preparative conditions. The injections were 0.1 to 2 mL depending on the semi-preparative and preparative conditions.

### 2.5. Identification of stilbenes

#### 2.5.1. LC-MS measurements

The analyses were carried on an Agilent® 1200 HPLC system coupled with a DAD and a mass spectrometer Bruker® Esquire® 3000+ (ionization mode: Electrospray (ESI), analyzer: ion trap). The chromatography conditions were the same as for analytical HPLC (same solvents, same column, same flow and gradient).

#### 2.5.2. NMR measurements

NMR spectra for all compounds were performed on a Bruker® 600 MHz spectrometer (Billerica, USA). Deuterated acetone was used as solvent for NMR experiments (except for resveratrol diglucoside which was performed in methanol-*d*<sub>4</sub>). One-dimensional NMR (proton <sup>1</sup>H, carbon <sup>13</sup>C) and two-dimensional NMR measurements (including COSY, HSQC, HMBC and ROESY) were performed in order to identify the compounds. At least 1 mg of each pure compound was required for structural elucidation.

#### 2.5.3. Polarimetric measurements

Optical rotations were determined in methanol at 20°C on a JASCO® (Jasco-France, Bouguenais, France) P-2000 polarimeter using sodium emission wavelength.

### 2.6. Stilbenes quantification

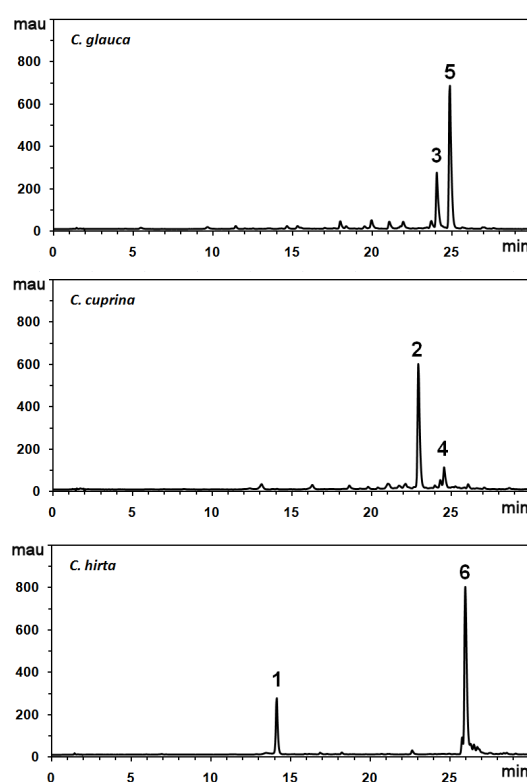
Because no commercial standard exists, quantification of individual stilbenes were performed using isolated compounds. Quantification was performed by HPLC-DAD analysis on an Agilent® 1100 Series system by using the same HPLC-DAD conditions previously described. Extracts were dissolved at 1 mg/mL in methanol and 20 µL of these solutions were injected. The identity of each peak was verified in parallel with LC-MS for each *Carex* sample. Stilbene concentrations were

determined by reporting the measured integration area of each compound. Mean values of each extract were calculated from three replicates. For the calibrations, the same volume of injection was used. Seven solutions including blank were prepared for each pure isolated stilbenoid compound (0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.05 and 0.1 mg/mL in 50% methanol). Each concentration was injected five times.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Structure elucidation

Extracts were prepared from roots of five *Carex* species: *C. capillacea*, *C. buchananii*, *C. hirta*, *C. glauca* and *C. cuprina* cultivated in the botanical garden of Talence (France). The genus *Carex* has been divided into many sections primarily on the basis of morphological data and data from cladistic [9].



**Figure 1.** HPLC-DAD chromatograms (306 nm) of three *Carex* extracts.

*Carex* extracts were analyzed by HPLC-DAD in order to investigate their stilbene constituents. Chromatograms of *C. hirta*, *C. cuprina* and *C. glauca* are presented in Figure 1. These extracts were further purified on reverse-phase preparative scale HPLC using appropriate mixtures of methanol and water. In this way, the six stilbenes were isolated. The isolated resveratrol monomer and oligomers were identified on the basis of MS (Table 1) and NMR (Tables 2 and 3) data.

Compound **1** was isolated from *Carex hirta*,  $t_R$  HPLC-DAD = 14.1 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  553; theoretical mass  $m/z$  553.2; corresponding formula:  $C_{26}H_{33}O_{13}$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : + 42° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data (see Tables 2 and 3) were consistent with those previously described [10].

Compound **2** was isolated from *Carex cuprina*,  $t_R$  HPLC-DAD = 22.9 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  941; theoretical mass  $m/z$  941.3; corresponding formula:  $C_{56}H_{45}O_{14}$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : + 87° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data were reported in Tables 2 and 3. These data were consistent with a new stilbene oligomer.

Compound **3** was isolated from *Carex glauca*,  $t_R$  HPLC-DAD = 24.0 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  681; theoretical mass  $m/z$  681.2; corresponding formula:  $C_{42}H_{33}O_9$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : + 90° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data (see Tables 2 and 3) were consistent with those previously described [4,11].

Compound **4** was isolated from *Carex buehnanii* and *Carex cuprina*,  $t_R$  HPLC-DAD = 24.5 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  925; theoretical mass  $m/z$  925.3; corresponding formula:  $C_{56}H_{45}O_{13}$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : + 201° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data (see Tables 2 and 3) were consistent with those previously described [11].

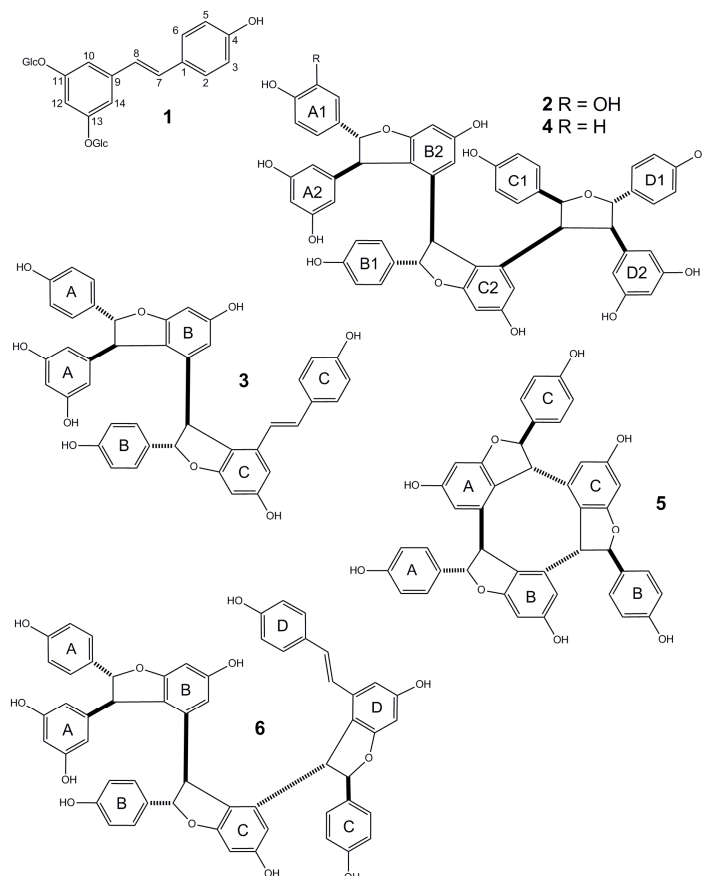
Compound **5** was isolated from *Carex glauca*,  $t_R$  HPLC-DAD = 24.9 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  679; theoretical mass  $m/z$  679.2; corresponding formula:  $C_{42}H_{31}O_9$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : + 33° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data (see Tables 2 and 3) were consistent with those previously described [12].

Compound **6** was isolated from *Carex capillacea* and *Carex hirta*,  $t_R$  HPLC-DAD = 26.0 min. Experimental mass ESI-MS (positive mode)  $m/z$  907; theoretical mass  $m/z$  907.3; corresponding formula:  $C_{56}H_{43}O_{12}$ .  $[\alpha]_D^{20}$ : - 69° (c 0.2, MeOH).  $^1H$ - and  $^{13}C$ -NMR data (see Tables 2 and 3) were consistent with those previously described [4,13,14].

**Table 1.** Chromatographic data (peak number and retention time) and  $m/z$  values of stilbenes isolated in *Carex* species.

Peak	$t_R$ (mn)	$MH^+$ (m/z)	Stilbenes
<b>1</b>	14.1	553	resveratrol diglucoside
<b>2</b>	22.9	941	carexinol A
<b>3</b>	24.0	681	(E)-miyabenol C
<b>4</b>	24.5	925	kobophenol A
<b>5</b>	24.9	679	(+)- $\alpha$ -viniferine
<b>6</b>	26.0	907	(E)-miyabenol A

Peaks are identified as follows: (E)-resveratrol 3,5-O- $\beta$ -diglucoside (**1**), carexinol A (**2**), (E)-miyabenol C (**3**), kobophenol A (**4**), (+)- $\alpha$ -viniferin (**5**) and (E)-miyabenol A (**6**) (Fig. 2). The Chromatographic data (peak number and retention time) and the  $m/z$  values of each isolated stilbenes are shown in Table 1. Using NMR and HPLC-ESI-MS compounds **3** to **6** were identified as known stilbenes from *Carex* species: (E)-miyabenol C (**3**), kobophenol A (**4**) and (+)- $\alpha$ -viniferin (**5**) and (E)-miyabenol A (**6**). Miyabenol A (**6**) was first isolated as constituent of *Carex fedia* var. *Miyabei* [4]. Kobophenol A (**4**) was isolated from *Carex kobomugi* together with miyabenol C (**3**) and  $\epsilon$ -viniferin [15] and was recently identified in *Carex folliculata* [8]. Finally, (+)- $\alpha$ -viniferin (**5**) was previously purified from the root of *Carex humilis* [16]. All these compounds present potential biological properties. (+)- $\alpha$ -viniferin is an inhibitor of cyclooxygenase activity of prostaglandin H2 synthase [16]. Miyabenol A has antibiotic activities against Gram positive bacteria [4] and anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production [17]. Kobophenol A has antioxidant and antibacterial activities [8]. Moreover kobophenol A has neuroprotective effects against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells [18]. Miyabenol C shows antimicrobial activities [11] and protein kinase C inhibitor activity [19].



**Figure 2.** Chemical structures of identified stilbenes.

Concerning compound **1**, HPLC-ESI-MS (positive mode) showed an ion at  $m/z$  553 allowing the formula  $C_{26}H_{33}O_{13}$  (calcd.  $C_{26}H_{32}O_{13}$  for: 553.2). The one dimensional NMR data of **1** showed characteristic signals of a resveratrol structure (Tables 2 and 3). Indeed the resonance set, between  $\delta$  6.7 and 7.4 ppm, composed of three systems of two olefinic and seven aromatic protons, was typical for resveratrol [20]. Furthermore the resonance set, between  $\delta$  3.7 and 4.0 ppm, was attributed to two  $\beta$ -glycosyl units linked to an aromatic ring and one doublet at  $\delta$  4.94 ppm (2H,  $J = 7.2$  Hz) was attributed to the two anomeric protons. The overlapped signals of the two glycosyl units indicated that they were on symmetrical positions. The assignment of the resveratrol moiety as *trans* was due to the presence of the coupling constant of the olefinic proton signals at  $\delta$  6.89 and 7.08 (each,  $J = 16.4$  Hz). Finally, NMR and MS data indicated that compound **1** was (E)-resveratrol 3,5-O- $\beta$ -diglucoside previously identified in *Vitis vinifera* cell suspension cultures [10]. To our acknowledgment, this compound is identified for the first time in the *Carex* genus.

**Table 2.** <sup>1</sup>H-NMR data of identified stilbenes at 300 K.

<b>H</b>	<b>1*</b>	<b>2**</b>	<b>3**</b>	<b>4**</b>	<b>5**</b>	<b>6**</b>
2a	7.38 <i>d</i> (8)	7.04 <i>d</i> (2)	7.15 <i>d</i> (8)	7.33 <i>d</i> (8)	7.22 <i>d</i> (8)	6.81 <i>d</i> (8)
3a	6.78 <i>d</i> (8)		6.83 <i>d</i> (8)	6.88 <i>d</i> (8)	6.82 <i>d</i> (8)	6.63 <i>d</i> (8)
5a	6.78 <i>d</i> (8)	6.85 <i>d</i> (8)	6.83 <i>d</i> (8)	6.88 <i>d</i> (8)	6.82 <i>d</i> (8)	6.63 <i>d</i> (8)
6a	7.38 <i>d</i> (8)	6.82 <i>dd</i> (2;8)	7.15 <i>d</i> (8)	7.33 <i>d</i> (8)	7.22 <i>d</i> (8)	6.81 <i>d</i> (8)
7a	6.89 <i>d</i> (16)	5.43 <i>d</i> (2)	5.37 <i>d</i> (5)	5.50 <i>brs</i>	5.94 <i>d</i> (10)	5.11 <i>d</i> (6)
8a	7.08 <i>d</i> (16)	4.36 <i>d</i> (2)	4.62 <i>d</i> (5)	4.31 <i>brs</i>	4.70 <i>d</i> (10)	4.12 <i>d</i> (6)
10a	6.94 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.15 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)		5.90 <i>d</i> (2)
12a	6.75 <i>d</i> (2)	6.02 <i>t</i> (2)	6.20 <i>t</i> (2)	6.03 <i>t</i> (2)	6.24 <i>d</i> (2)	6.09 <i>t</i> (2)
14a	6.94 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.15 <i>d</i> (2)	6.01 <i>d</i> (2)	6.05 <i>d</i> (2)	5.90 <i>d</i> (2)
2(6)b		6.20 <i>d</i> (8)	6.49 <i>d</i> (8)	6.19 <i>d</i> (8)	7.02 <i>d</i> (8)	6.58 <i>d</i> (8)
3(5)b		6.50 <i>d</i> (8)	6.64 <i>d</i> (8)	6.50 <i>d</i> (8)	6.72 <i>d</i> (8)	6.42 <i>d</i> (8)
7b		4.99 <i>d</i> (4)	5.18 <i>brs</i>	4.98 <i>d</i> (4)	6.07 <i>brs</i>	5.08 <i>d</i> (2)
8b		3.50 <i>d</i> (4)	4.30 <i>d</i> (2)	3.48 <i>d</i> (4)	3.97 <i>brs</i>	4.68 <i>d</i> (2)
10b						
12b		6.49 <i>d</i> (2)	6.32 <i>d</i> (2)	6.51 <i>d</i> (2)	6.22 <i>d</i> (2)	6.31 <i>d</i> (2)
14b		5.95 <i>d</i> (2)	6.05 <i>d</i> (2)	5.95 <i>d</i> (2)	6.00 <i>d</i> (2)	5.97 <i>d</i> (2)
2(6)c		6.45 <i>d</i> (8)	7.10 <i>d</i> (8)	6.40 <i>d</i> (8)	7.05 <i>d</i> (8)	6.61 <i>d</i> (8)
3(5)c		6.59 <i>d</i> (8)	6.74 <i>d</i> (8)	6.58 <i>d</i> (8)	6.78 <i>d</i> (8)	6.64 <i>d</i> (8)
7c		5.21 <i>d</i> (4)	6.87 <i>d</i> (16)	5.04 <i>d</i> (4)	4.91 <i>d</i> (8)	5.11 <i>d</i> (2)
8c		3.37 <i>dd</i> (6;4)	6.58 <i>d</i> (16)	3.28 <i>dd</i> (6;4)	4.62 <i>d</i> (8)	4.31 <i>d</i> (2)
10c						
12c		5.99 <i>d</i> (2)	6.32 <i>d</i> (2)	5.99 <i>d</i> (2)	6.25 <i>d</i> (2)	6.18 <i>d</i> (2)
14c		6.43 <i>d</i> (2)	6.65 <i>brs</i>	6.41 <i>d</i> (2)		6.05 <i>d</i> (2)
					6.72 <i>brs</i>	
2(6)d		7.10 <i>d</i> (8)		7.07 <i>d</i> (8)		7.00 <i>d</i> (8)
3(5)d		6.78 <i>d</i> (8)		6.76 <i>d</i> (8)		6.71 <i>d</i> (8)
7d		5.17 <i>d</i> (11)		5.14 <i>d</i> (11)		6.87 <i>d</i> (16)
8d		3.20 <i>dd</i> (11;6)		3.09 <i>dd</i> (11;6)		6.63 <i>d</i> (16)
10d		5.81 <i>d</i> (2)		5.79 <i>d</i> (2)		
12d		6.09 <i>d</i> (2)		6.08 <i>t</i> (2)		6.34 <i>d</i> (2)
14d		5.81 <i>d</i> (2)		5.79 <i>d</i> (2)		6.67 <i>d</i> (2)
Glucose						
1'-1''	4.94 <i>d</i> (7)					
2'-2''	3.36-3.56					
3'-3''	3.36-3.56					
4'-4''	3.36-3.56					
5'-5''	3.36-3.56					
6'-6''	3.94 <i>dd</i> (12;2)					
	3.70 <i>dd</i> (12;6)					

\*methanol-*d*<sub>4</sub>; \*\*acetone-*d*<sub>6</sub>.

**Table 3.**  $^{13}\text{C}$ -NMR data of identified stilbenes at 300 K.

C	1*	2**	3**	4**	5**	6**
1a	128.2	136.3	133.0	135.0	131.3	132.6
2a	129.4	112.5	127.4	126.3	127.7	128.3
3a	115.7	146.0	116.2	115.9	115.6	115.9
4a		145.5	158.1	157.6	158.4	157.9
5a	115.7	116.3	116.2	115.9	115.6	115.9
6a	129.4	117.0	127.4	126.3	127.7	128.3
7a	129.6	92.9	94.4	92.1	89.7	95.1
8a	125.5	58.2	57.0	57.8	52.5	56.1
9a	140.6	147.9	147.3	147.3	147.0	147.3
10a	108.8	106.8	106.8	106.2	120.9	107.0
11a	157.7	159.9	160.8	159.0	159.0	159.8
12a	104.1	102.0	102.0	101.5	96.2	102.4
13a	157.5	159.9	160.8	159.0	157.0	159.8
14a	108.8	106.8	106.8	106.2	105.1	107.0
1b		133.7	133.0	133.1	131.5	132.9
2(6)b		127.4	127.1	126.7	127.8	127.9
3(5)b		116.0	115.3	115.4	115.2	115.7
4b		157.4	157.2	156.9	157.1	157.9
7b		93.6	92.0	93.0	86.1	92.5
8b		52.4	50.9	52.0	46.2	49.9
9b		144.7	142.6	148.0	139.9	142.8
10b		120.3	120.0	119.4	118.8	119.2
11b		162.1	160.7	161.4	158.0	162.9
12b		96.1	96.0	96.2	97.2	96.7
13b		160.7	158.3	160.5	162.4	160.2
14b		108.4	107.4	107.8	108.2	124.1
1c		134.5	131.5	131.4	132.0	133.4
2(6)c		127.8	128.4	127.1	128.3	127.4
3(5)c		115.4	115.3	114.8	115.5	116.0
4c		156.0	157.2	155.6	157.5	157.9
7c		85.0	130.9	84.4	95.4	93.1
8c		52.7	122.4	52.1	55.6	51.5
9c		136.7	136.5	132.9	141.0	142.9
10c		124.4	121.0	120.0	119.7	120.0
11c		160.9	162.5	160.3	161.0	162.1
12c		95.8	96.8	95.3	96.2	96.7
13c		158.8	159.2	153.8	161.0	160.2
14c		110.6	104.1	109.9	105.8	107.2
1d		134.6		134.1		129.2
2(6)d		129.0		128.4		128.9
3(5)d		116.1		115.4		116.9
4d		157.7		157.1		158.0
7d		85.4		84.8		131.6
8d		62.1		61.8		122.5
9d		139.6		136.7		136.4
10d		109.3		108.6		120.9
11d		158.3		158.0		162.2
12d		103.4		102.9		97.1
13d		158.3		158.0		159.5
14d		109.3		108.6		104.4
Glucose						
1'-1''	101.6					
2'-2''	74.2					
3'-3''	77.2					
4'-4''	71.3					
5'-5''	77.5					
6'-6''	62.4					

\* methanol- $d_4$ ; \*\*acetone- $d_6$ .

Compound **2** was obtained as a pale brown solid. HPLC-ESI-MS (positive mode) showed an ion at  $m/z$  941 allowing the formula  $\text{C}_{56}\text{H}_{45}\text{O}_{14}$  (calcd.  $\text{C}_{56}\text{H}_{45}\text{O}_{14}$  for: 941.3). Assignments of all  $^1\text{H}$  and

$^{13}\text{C}$  signals for **2** were made by analyzing COSY, HSQC, and HMBC two-dimensional NMR spectroscopic data. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  data (Tables 2 and 3) are consistent with a linear-type of resveratrol tetramer. These data show the presence of three 4-hydroxyphenyl groups (B1, C1 and D1), two 3,5-dihydroxyphenyl groups (A2 and D2), a 3,4-dihydroxyphenyl groups (A1), two 3,5-dioxygenated-1,2-disubstituted benzene ring (B2 and C2), two sequences of dihydrobenzofuran protons (H-7a/H-8a, H-7b/H-8b) and a tetrahydrofuran system (H-8c/H-7c/H-7d/H-8d). The assignments all NMR resonances for **2** were achieved as shown in Table 4 by making use of HMBC spectrum. The relative stereochemical configuration of **2** was determined from ROESY experiments. The presence of NOEs between H-7a/H-10(14)a and H-8a/H-2(6)a indicates a *trans* dihydrobenzofuran system for unit A. NOEs between H-7b/H-14b and H-8b/H-2(6)b support a similar relationship for the dihydrobenzofuran system of unit B. NOE correlations between H-7c/H-8c, H-7c/H-8d and H-8c/H-8d indicate the relative stereochemistry of the tetrahydrofuran system. Cross NOEs between H-8a, H-8b and H-8c show the spatial vicinity of these protons. These results suggest the relative stereochemistry to be that shown in Figure 2. This configuration is also supported by relatively lower chemical shifts of H-10(14)a and H-2(6)b, 6.01 and 6.20 ppm respectively, which result from overlapping of rings A2 and B1. Taking into account NMR and MS data, it was concluded that compound was a new resveratrol oligomer called carexinol A.

**Table 4.** Major HMBC correlations of carexinol A (**2**).

C	HMBC	C	HMBC
1a	5a, 7a, 8a	1c	3(5)c, 7c, 8c
2a	6a, 7a	2(6)c	2(6)c, 3(5)c, 7c
3a	5a	3(5)c	2(6)c, 3(5)c
4a	2a, 6a	4c	2(6)c, 3(5)c
5a	-	7c	2(6)c, 8c
6a	2a, 7a	8c	7c, 14c, 8d
7a	2a, 6a, 8a	9c	7c, 8c, 8d
8a	7a, 10(14)a	10c	8c, 12c, 14c, 7b, 8b
9a	7a, 8a	11c	7b, 8b
10(14)a	8a, 12a, 10(14)a	12c	14c
11(13)a	10(14)a	13c	12c, 14c
12a	10(14)a	14c	8c, 12c
1b	3(5)b, 7b, 8b	1d	7d, 8d, 3(5)d
2(6)b	2(6)b, 3(5)b, 7b	2(6)d	7d, 2(6)d, 3(5)d
3(5)b	2(6)b, 3(5)b	3(5)d	2(6)d, 3(5)d
4b	2(6)b, 2(6)b	4d	2(6)d, 3(5)d
7b	2(6)b, 8b	7d	2(6)d, 8d
8b	7b, 14b	8d	7d, 10(14)d, 8c
9b	7b, 8b	9d	7d, 8d, 8c
10b	7a, 8a, 8b, 12b, 14b	10(14)d	12d
11b	7a, 8a, 12b	11(13)d	10(14)d
12b	14b	12d	10(14)d
13b	12b, 14b		
14b	8b, 12b		

### 3.2 Total contents of stilbenes

The concentrations of stilbenes in *Carex* extracts were determined by HPLC-DAD measurements at 306 nm (wavelength corresponding to the average  $\lambda_{\text{max}}$  of identified stilbenes) using an external calibration method with pure stilbenes. Concerning calibrations, the linearity was verified in the range of concentrations used and volume of injection (0 – 0.1 mg/mL, 20  $\mu\text{L}$ ) for each compound. The calibration data are given in table 5.



**Table 5.** Calibration parameters of the HPLC quantification method of the stilbenoid compounds.

Compound	Regression equation *	Correlation coefficient ( $r^2$ )	LOD $\mu\text{g/mL}$	LOQ $\mu\text{g/mL}$
resveratrol diglucoside	$Y = 181057C + 24.504$	0.99927	0.745	2.166
carexinol A	$Y = 1317C - 0.224$	0.99469	1.815	5.655
(E)-miyabenol C	$Y = 8481.6C + 7.447$	0.99891	1.621	3.353
kobophenol A	$Y = 1840.4C + 0.558$	0.99509	1.885	5.578
(+)- $\alpha$ -viniferine	$Y = 5169.9C + 2.698$	0.99925	1.138	2.575
(E)-miyabenol A	$Y = 17634C + 3.531$	0.99958	0.675	1.75

where C is the concentration of compound in mg/mL and Y is the peak area. LOD is the limit of detection, LOQ is the limit of quantification. Confidence limit 95%, n = 5 repeats, N = 7 concentrations, volume of injection = 20  $\mu\text{L}$ .

The average content of the six stilbenes in the different *Carex* species are shown in Table 6. The total concentrations of identified stilbenes were thus determined at 3.5 mg/g for *C. capillacea*, 7.6 mg/g for *C. buehnerii*, 2.8 mg/g for *C. hirta*, 8.9 mg/g *C. glauca* and 5.0 mg/g for *C. cuprina*. From all data reported above, we can state that *Carex* species are rich in stilbenes. These *Carex* species can be distinguished by studying the stilbene content. Indeed, some stilbenes seem characteristic of specific species (resveratrol diglucoside was detected only in *C. hirta*, miyabenol C and  $\alpha$ -viniferin only in *C. glauca* and carexinol A only in *C. cuprina*).

**Table 6.** Average content of stilbenes in root *Carex* species (mg/g).

Stilbenes	<i>C. capillacea</i>	<i>C. hirta</i>	<i>C. cuprina</i>	<i>C. glauca</i>	<i>C. buehnerii</i>
resveratrol diglucoside (1)	-	0.7 $\pm$ 0.1	-	-	-
carexinol A (2)	-	-	2.8 $\pm$ 0.2	-	-
(E)-miyabenol C (3)	-	-	-	3.4 $\pm$ 0.1	-
kobophenol A (4)	-	-	2.2 $\pm$ 0.2	-	3.7 $\pm$ 0.2
(+)- $\alpha$ -viniferine (5)	-	-	-	5.5 $\pm$ 0.1	-
(E)-miyabenol A (6)	3.5 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.1	-	-	3.9 $\pm$ 0.1

Concerning individual compounds, resveratrol diglucoside (1) is the less abundant component and was only detectable in *Carex hirta*. This molecule is already known in *Vitis vinifera* [10] but had never been identified in *Carex* genus and Cyperaceae family. The new stilbene tetramer carexinol A (2) was only identified in *Carex cuprina*. Miyabenol C (3) and  $\alpha$ -viniferin (5) are detected in *Carex glauca*. These molecules are already known in *Carex kobomugi* [11] and *Carex humilis* [16]. Kobophenol A (4) was detected in *Carex cuprina* and *Carex buehnerii*. This molecule is already known in *Carex kobomugi* [11] and *Carex folliculata* [8]. Miyabenol A (6) was detected in *Carex hirta* and *Carex buehnerii*. This molecule is already known in *Carex fedia* [4].

To conclude, in order to isolate complex stilbenes, our study shows that *Carex* genus seems one of the most promising in the Cyperaceae family. The presence of stilbenes is certainly not restricted to an organ but is globally much more important in roots according to our preliminary investigations of aerial parts of the plants (data not shown). Analyses by HPLC-MS and RMN allowed the identification of numerous molecules: a carexinol A (which is a new compound), (E)-miyabenol A, (E)-miyabenol C, kobophenol A, (+)- $\alpha$ -viniferin and (E)-resveratrol 3,5-O- $\beta$ -diglucoside already known in vine. These stilbenes obtained in great quantities are going to allow us to make biological tests to estimate their pharmacological potentialities.

## Acknowledgments

Financial support of the Tunisian Ministry of "Enseignement Supérieur, Recherche Scientifique et Technologie" are gratefully acknowledged. NMR and MS experiments were undertaken at the Metabolome Facility of Bordeaux Functional Genomic Center (Bordeaux, France).

## References

- [1] C. Rivière, A.D. Pawlus and J.M. Mérillon (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae, *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1317-1333.
- [2] S. Renaud and M. Lorget (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *The Lancet* . **339**, 1523-1526.
- [3] B. Fauconneau, P. Waffo-Téguo, F. Huguet, L. Barrier, A. Decendit and J.M. Mérillon (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests, *Life. Sci.* **61**, 2103-10.
- [4] K. Suzuki, T. Shimizu, J. Kawabata and J. Mizutani (1987). New 3,5,4'-trihydroxystilbene (resveratrol) oligomers from *Carex fedia* Nees var. miyabei (franchet) T. Koyama (*Cyperaceae*), *Agr. Biol. Chem.* **51**, 1003-1008.
- [5] C.R. Pace-Asciak, S. Hahn, E.P. Diamands, G. Soleas and D.M Goldberg (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and protection against coronary heart disease, *Clin. Chim. Acta.* **235**, 207-17.
- [6] M.J. Jang, I. Cai, G.O. Udeani, K.V. Slowing, C.F. Thomas and C.W.W. Beecher (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived grape., *Science.* **275**, 218-20.
- [7] X. Vitrac, J.P. Monti, J. Vercauteren, G. Deffieux and J.M. Mérillon (2002). Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection, *Analytica. Chimica. Acta.* **458**, 103-110.
- [8] L. Li, G.E. Henry and N.P. Seeram (2009). Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *J. Agric. Food. Chem.* **57**, 7282-7287.
- [9] F. Hendrichs, F. Oberwinkler, D. Begerow and R. Bauer (2004). *Carex*, subgenus *Carex* (Cyperaceae)- A phylogenetic approach using ITS sequences, *Plant. Syst. Evol.* **246**, 89-107.
- [10] F. Larronde, T. Richard, J.C. Delaunay, A. Decendit, J.P. Monti, S. Krisa and J.M. Merillon (2005). New stilbenoid glucosides isolated from *Vitis vinifera* cell suspension cultures (cv. Carbernet Sauvignon), *Planta. Med.* **71**, 888-890.
- [11] H. Kurihara, J. Kawabata, S. Ichikawa, M. Mishima and J. Mizutani (1991). Oligostilbenes from *Carex kobomugi*, *Phytochemistry* **30**, 649-653.
- [12] S. Kitanaka, T. Ikezawa, K. Yasukawa, S. Yamanouchi, M. Takido , H. Kil Sung and I.H. Kim (1990). (+)- $\alpha$ -Viniferin, an anti-inflammatory compound from *Caragana chamlagu* root, *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 432-435.
- [13] J. Kawabata, M. Mishima, H. Kurihara and J. Mizutani (1995). Stereochemistry of two tetrastilbenes from *Carex* species, *Phytochemistry.* **40**, 1507-1510.
- [14] H. Kurihara, J. Kawabata, S. Ichikawa and J. Mizutani (1990). (-)- $\epsilon$ -Viniferin and related oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb. (Cyperaceae), *Agric. Biol. Chem.* **54**, 1097-1099.
- [15] J. Kawabata, S. Ichikawa, H. Kurihara and J. Mizutani (1989). Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* (Cyperaceae), *Tetrahedron. Lett.* **30**, 3785-3788.
- [16] S.H. Lee, N.H. Shin, S.H. Kang, J.S. Park, S.R. Chung, K.R. Min and Y. Kim (1998).  $\alpha$ -Viniferin: A prostaglandin H2 synthase inhibitor from root of *Carex humilis*, *Planta. Med.* **64**, 204-207.
- [17] K.T. Ku, Y.L. Huang, Y.J. Huang and W.F. Chiou (2008). Miyabenol A inhibits LPS-induced NO production via IKK/ $\kappa$ B inactivation in RAW 264.7 macrophages : possible involvement of the p38 and PI3K pathways, *J. Agric. Food. Chem.* **56**, 8911-8918.
- [18] S.R. Lee, J.H. Kwak, H.J. Kim and S. Pyo (2007). Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **17**, 1879-1882.
- [19] P. Kulanthavel, W. Janzen, L. Ballas, J. Jiang, C.Q. Hu, J. Darges, J. Seldin and D. Cofield (2007). Naturally Occurring Protein Kinase C Inhibitors; III. Isolation of Oligomeric Stilbenes from *Caragana sinica*, *Planta Med.* **61**, 41-44.
- [20] F. Mattivi, R. Reniero and S.J. Korhammer (1995). Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers, *J. Agric. Food. Chem.* **43**, 1820-3.

**A C G**  
publications

© 2013 Reproduction is free for scientific studies

En marge de mon sujet de Thèse sur les stilbènes de Cypéracées, j'ai aussi participé à d'autres travaux au sein de l'équipe GESVAB. Nous avons ainsi étudié la composition en stilbènes de sous-produits de la Vigne. Nous avons étudié particulièrement une poudre commerciale d'extrait de sarments de Vigne, le Vineatrol®, qui nous a été confiée par la société Actichem SA (Montauban). J'ai participé aux travaux d'extraction, de purification et d'identification de différents stilbènes.

Ces travaux ont permis de réaliser un article dans un journal à comité de lecture :

Nassima Chaher, Kamel Arraki, Elsa Dillinseger, Hamza Temsamani, Stéphane Bernillon, Eric Pedrot, Jean-Claude Delaunay, Jean-Michel Mérillon, Jean-Pierre Monti, Jean-Claude Izard, Djebbar Atmania and Tristan Richard

Bioactive stilbenes from *Vitis vinifera* grapevine shoots extracts

*J. Sci. Food Agric.*, 2014; **94**: 951–954

#### Résumé de l'article

A partir de cet extrait de sarments de Vigne, nous avons ainsi pu isoler un nouvel oligomère de resvératrol, le (Z)-cis-miyabenol C. Nous avons aussi isolé deux nouveaux oligomères qui n'avaient pas été encore signalés dans les sarments, le vitisinol C et le (E)-miyabénol C, ainsi que six composés déjà connus : le picéatannol, le resvératrol, la (E)- $\epsilon$ -viniférine (ou trans- $\epsilon$ -viniférine), l'a-viniférine et le (E)-miyabénol C. Les structures chimiques de ces dérivés du resvératrol ont été établies par différentes techniques de spectrométrie incluant la RMN. Tous les nouveaux composés isolés ont été testés pour évaluer leurs activités anti-agrégatives contre la formation de fibrilles de peptides  $\beta$ -amyloïdes. Le vitisinol C a montré une forte activité contre l'agrégation du  $\beta$ -amyloïde.

L'article est joint dans les pages suivantes.

## Bioactive stilbenes from *Vitis vinifera* grapevine shoots extracts

Nassima Chaher,<sup>a</sup> Kamel Arraki,<sup>b</sup> Elsa Dillinseger,<sup>c</sup> Hamza Tamsamani,<sup>b</sup> Stéphane Bernillon,<sup>c</sup> Eric Pedrot,<sup>b</sup> Jean-Claude Delaunay,<sup>b</sup> Jean-Michel Mérillon,<sup>b</sup> Jean-Pierre Monti,<sup>b</sup> Jean-Claude Izard,<sup>d</sup> Djebbar Atmani<sup>a</sup> and Tristan Richard<sup>b\*</sup>



### Abstract

**BACKGROUND:** Viticultural residues from commercial viticultural activities represent a potentially important source of bioactive stilbenes such as resveratrol. The main aim of the present study was therefore to isolate, identify and perform biological assays against amyloid- $\beta$  peptide aggregation of original stilbenes from *Vitis vinifera* shoots.

**RESULTS:** A new resveratrol oligomer, (Z)-cis-miyabenol C (3), was isolated from *Vitis vinifera* grapevine shoots together with two newly reported oligostilbenes from *Vitis vinifera* shoots, vitisinol C (1) and (E)-cis-miyabenol C (2), and six known compounds: piceatannol, resveratrol, (E)- $\epsilon$ -viniferin (trans- $\epsilon$ -viniferin),  $\omega$ -viniferin, vitisinol C and (E)-miyabenol C. The structures of these resveratrol derivatives were established on the basis of detailed spectroscopic analysis including nuclear magnetic resonance experiments. All the newly reported compounds were tested for their anti-aggregative activity against amyloid- $\beta$  fibril formation. Vitisinol C was found to exert a significant activity against amyloid- $\beta$  aggregation.

**CONCLUSION:** *Vitis vinifera* grapevine shoots are potentially interesting as a source of new bioactive stilbenes, such as vitisinol C.

© 2013 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

**Keywords:** stilbene; *Vitis vinifera*; amyloid- $\beta$ ; NMR; LC-MS

### INTRODUCTION

Grapes (*Vitis vinifera*) are one of the most widely consumed fruits worldwide, whether as fresh fruit or in processed form such as juice and wine. Naturally occurring stilbenes from grapes and wine are receiving more attention because they demonstrate multi-faceted bioactivities.<sup>1</sup> Grape canes, such as viticultural residue from commercial viticultural activities, represent a potentially important source of stilbenes such as resveratrol and  $\epsilon$ -viniferin.<sup>2</sup> In the present study, the identification of a novel oligostilbene, (Z)-cis-miyabenol C (3), is reported together with seven known compounds from *Vitis vinifera* grapevine shoot extracts: piceatannol, resveratrol, (E)- $\epsilon$ -viniferin (trans- $\epsilon$ -viniferin),  $\omega$ -viniferin, vitisinol B, (E)-miyabenol C and (E)-cis-miyabenol C. Moreover, vitisinol C (1) and (E)-cis-miyabenol C (2) were isolated for the first time from *Vitis vinifera* grapevine shoot extracts.

Stilbenes exhibit a wide range of biological and pharmacological properties,<sup>3–6</sup> including anti-ageing effects.<sup>6–8</sup> *In vitro* assays revealed that resveratrol inhibited the formation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) fibrils.<sup>9,10</sup> Moreover,  $\epsilon$ -viniferin glucoside has been shown to inhibit A $\beta$  aggregation and to protect PC12 cells against A $\beta$ -induced toxicity.<sup>11,12</sup> Thus, stilbenes could be of therapeutic value to prevent Alzheimer's disease. For this aim, the isolated

compounds were tested for anti-aggregative activity against A $\beta$  fibril formation.

### MATERIALS AND METHODS

#### General procedure

Optical rotations were measured in methanol at 20°C on a JASCO P-2000 polarimeter using sodium emission wavelength (JASCO France, Bouguenais, France). UV spectra were taken on a Varian Cary 300 UV-visible spectrometer (Agilent Technologies, Massy, France).

\* Correspondence to: Tristan Richard, GESVAB (EA 3675), RMN Polyphénols et Santé, Site INRA de Bordeaux, Bât. 3A, 71 Avenue Edouard Bourleaux, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France. E-mail: tristan.richard@u-bordeaux2.fr

a Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Laboratoire de Biochimie Appliquée, Bejaia 06000, Algérie

b Université de Bordeaux, ISVV, EA 3675 GESVAB, 33882 Villenave d'Ornon, France

c INRA – UMR 1332 BFP, Centre INRA de Bordeaux, Villenave d'Ornon, France

d Actichem S.A., 121 avenue du Danemark, 82000 Montauban, France

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer (600 MHz for  $^1\text{H}$  and 151 MHz for  $^{13}\text{C}$  experiments) at 300 K in the acetone- $d_6$  deuterated solvent (Bruker, Bremen, Germany). Spectra were referenced to the signal of acetone- $d_6$  at  $\delta_{\text{H}}$  2.06 and  $\delta_{\text{C}}$  29.9 ppm.

Accurate masses were measured on a micrOTOF-Q mass spectrometer (Bruker). Sample solutions were infused at  $3\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$ . Electrospray ionisation in negative mode was used. Each spectrum was calibrated with a  $10\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  lithium formate solution using the enhanced cubic calibration model from the micrOTOF control software (Bruker).

#### Extract

Vineatrol®30 was kindly provided by Actichem S.A. (Montauban, France) who develops and produces this grapevine shoot extract. This extract contains considerable amounts of stilbenoids: 15.2% resveratrol, 13.2% (*E*)- $\epsilon$ -viniferin, 4.4% ampelopsin A, 2.8% hopeaphenol, 2.1% iso-*trans*- $\epsilon$ -viniferin, 1.9% vitisin A, 1.9% vitisin B, 1.8% piceatannol and 1.6% (*E*)-miyabenol C.<sup>13</sup>

#### Preparative high-performance liquid chromatography

Vineatrol®30 (400 mg) was purified by semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) (Waters Alliance 2695 coupled with a diode array detector Waters PDA 996; Waters, Guyancourt, France) with a Kromasil 100-5-C18,  $10 \times 250\ \text{mm}$  column at room temperature.

Final purification was performed by semi-preparative HPLC (Waters Alliance 2695 coupled with a diode array detector Waters PDA 996) with a Kromasil 100-5-C18,  $10 \times 250\ \text{mm}$  column at room temperature. The flow rate was  $2.5\ \text{mL}\ \text{min}^{-1}$ . The solvent system used was water 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (solvent A) and methanol (solvent B). The gradient elution program was as follows (v/v): 0 min 30% B, 5 min 50% B, 50 min 50% B, 51 min 100% B, 59 min 100% B, 60 min 30% B, 68 min 30% B. The eluted compounds were manually collected at 280 nm and 310 nm. The semi-preparative HPLC yielded pure **1** (3 mg), **2** (2 mg) and **3** (2 mg).

#### Analytical high-performance liquid chromatography–mass spectrometry

The lyophilised extract was dissolved in 50% methanol and chromatographed using an HPLC-MS system. The chromatography apparatus was an Agilent 1200 from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). The grapevine shoot extract was analysed at  $25^\circ\text{C}$  with a  $250 \times 4\ \text{mm}\ \text{i.d.}$ ,  $5\ \mu\text{m}$ , ProntoSil 120-5-C18-AQ reverse-phase column, Bischoff (Leonberg, Germany). Water, 0.1%  $\text{HCOOH}$  (solvent A) and acetonitrile 0.1%  $\text{HCOOH}$  (solvent B) were used as mobile phases. The gradient elution program was as follows (v/v): 0 min 10% B, 20 min 20% B, 30 min 30% B, 40 min 30% B, 50 min 35% B, 70 min 60% B, 90 min 100% B, linear for 10 min, followed by 10 min for re-equilibration. The detection wavelengths were set at 280 and 310 nm. This HPLC was coupled to an Esquire 3000+ ion trap mass spectrometer using an ESI source from Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA). The HPLC output flow was split with a passive splitter at an average 1:100 ratio depending on the flow solvent, viscosity and rate.

#### Structural data of the isolated compounds

##### Vitisinol C (**1**)

A brown powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 358 (4.29) nm;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +46^\circ$  ( $c = 0.01, \text{MeOH}$ );  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ ) see Supplementary Table 1 in the 'Supporting information'. ESI-HRMS  $m/z$  427.1527  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{O}_5$  427.1551).

**Table 1.**  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectral data of (*Z*)-*cis*-miyabenol C (**3**) in acetone- $d_6$

Carbon	(Z)- <i>cis</i> -Miyabenol C ( <b>3</b> )	
	$^{13}\text{C}$ NMR	$^1\text{H}$ NMR
1a	128.7	—
2a(6a)	128.6	6.94 (2H, <i>d</i> , 8.2)
3a(5a)	114.9	6.59 (2H, <i>d</i> , 8.2)
4a	157.2	—
7a	90.2	5.67 (1H, <i>d</i> , 7.2)
8a	53.0	3.89 (1H, <i>d</i> , 7.2)
9a	142.3	—
10a(14a)	108.7	5.62 (2H, <i>d</i> , 2.1)
11a(13a)	158.6	—
12a	101.6	5.98 (2H, <i>t</i> , 2.1)
1b	133.3	—
2b(6b)	128.3	7.15 (2H, <i>d</i> , 8.2)
3b(5b)	116.0	6.88 (2H, <i>d</i> , 8.2)
4b	157.9	—
7b	93.3	5.25 (1H, <i>d</i> , 6.6)
8b	54.2	4.22 (1H, <i>d</i> , 6.6)
9b	140.9	—
10b	122.4	—
11b	161.8	—
12b	96.9	6.34 (1H, <i>d</i> , 2.1)
13b	158.7	—
14b	108.2	6.03 (1H, <i>d</i> , 2.1)
1c	133.1	—
2c(6c)	130.8	7.02 (2H, <i>d</i> , 8.2)
3c(5c)	115.5	6.67 (2H, <i>d</i> , 8.2)
4c	158.2	—
7c	130.8	6.18 (1H, <i>d</i> , 12.1)
8c	126.1	5.49 (1H, <i>d</i> , 12.1)
9c	135.2	—
10c	119.3	—
11c	162.6	—
12c	96.8	6.22 (1H, <i>d</i> , 2.1)
13c	158.9	—
14c	108.1	6.30 (1H, <i>d</i> , 2.1)

##### (*E*)-*cis*-Miyabenol C (**2**)

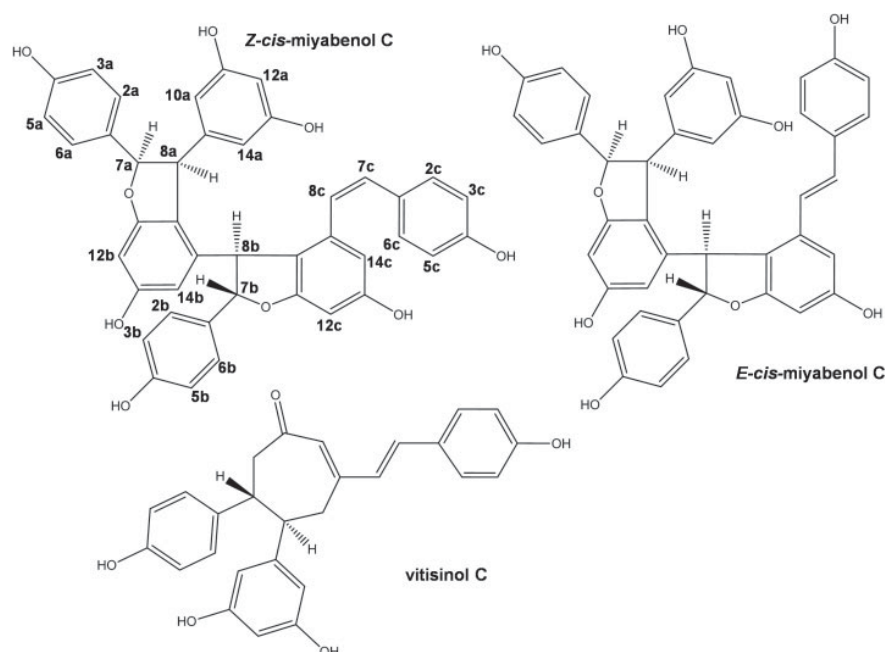
A brown powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 322 (4.05) nm;  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ ) see Supplementary Table 1 in the 'Supporting information'. ESI-HRMS  $m/z$  679.1942  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{42}\text{H}_{31}\text{O}_9$  679.1974).

##### (*Z*)-*cis*-Miyabenol C (**3**)

A brown powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 285 (4.13) nm;  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR (acetone- $d_6$ ), see Table 1; ESI-HRMS  $m/z$  679.1963  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd. for  $\text{C}_{42}\text{H}_{31}\text{O}_9$  679.1974).

#### Measurement of inhibitory activity by ultraviolet–visible spectroscopy

The detailed method for measuring the inhibitory activity on  $\text{A}\beta$  aggregation was given in a previous report.<sup>9</sup> Briefly, UV–visible measurements were used to search for inhibitors of  $\text{A}\beta$  fibril formation. Stock solutions of  $\text{A}\beta_{25-35}$  at  $1\ \text{mmol}\ \text{L}^{-1}$  were prepared by solubilising the lyophilised  $\text{A}\beta$  by vortexing briefly in sterile water at  $4^\circ\text{C}$ , then by sonicating for 10 min. Pure polyphenols were



**Figure 1.** Skeletal formulae of the original compounds found in grapevine shoots of *Vitis vinifera*: Vitisinol C (**1**), (*E*)-*cis*-miyabenol C (**2**) and (*Z*)-*cis*-miyabenol C (**3**).

solubilised in MeOH solution to a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. Stock solutions were aliquoted and stored at -20°C. UV-visible spectrometry was performed on a Cary 300 spectrophotometer (Varian). To study A $\beta$  fibril inhibition, experiments were carried out by using a reaction mixture containing 80  $\mu$ L phosphate buffer (10 mmol L<sup>-1</sup> final concentration, pH 7.2), 10  $\mu$ L A $\beta$ <sub>25-35</sub> (100  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> final concentration) and 10  $\mu$ L tested compound (10  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> final concentration).

## RESULTS AND DISCUSSION

As in Mattivi *et al.*,<sup>14</sup> *trans* and *cis* nomenclature was used only to describe the stereochemistry at saturated rings, whereas the stereochemistry of double bonds was described by the *Z/E* nomenclature. The names used in this study are in agreement with the nomenclature proposed by Mattivi *et al.*:<sup>14</sup> (*E*)- $\epsilon$ -viniferin (*trans*- $\epsilon$ -viniferin); (*Z*)-miyabenol C (*cis*-miyabenol C) and (*E*)-miyabenol C (*trans*-miyabenol C).

The *Vitis vinifera* grapevine shoot extract under investigation (Vineatrol®30; Actichem S.A.) was repeatedly chromatographed on analytical HPLC-MS and semi-preparative HPLC to identify new stilbenes. Vineatrol contains a complex mixture of bioactive oligomeric resveratrol derivatives.<sup>15-17</sup> A novel resveratrol trimer was identified and named (*Z*)-*cis*-miyabenol C (Fig. 1), together with seven known compounds: piceatannol, resveratrol, (*E*)- $\epsilon$ -viniferin (*trans*- $\epsilon$ -viniferin),  $\omega$ -viniferin, vitisinol C, (*E*)-miyabenol C and (*E*)-*cis*-miyabenol C. The presence of vitisinol C and (*E*)-*cis*-miyabenol in *Vitis vinifera* grapevine shoot extracts is reported here for the first time.

### (*Z*)-*cis*-Miyabenol C (**3**)

The positive ESI-HRMS mass spectrum of (**3**) revealed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  679.1942 [M-H]<sup>-</sup> consistent with the molecular formula C<sub>42</sub>H<sub>31</sub>O<sub>9</sub> (required 679.1974 for C<sub>42</sub>H<sub>31</sub>O<sub>9</sub>). The structure of (**3**) was elucidated by 1D- and 2D-NMR analysis (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR data are summarised in Table 1 and are consistent with a resveratrol trimer with the presence of one *cis*-resveratrol double bond in the structure. The <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectral NMR data of (**3**), together with COSY and HSQC spectra, showed a series of aromatic signals assignable to three 4-hydroxyphenyl groups, two 3,5-dihydroxy-1,2-disubstituted benzene rings and a 3,5-dihydroxyphenyl group. The NMR spectral data also disclosed the presence of two sets of aliphatic signals characteristic of a 2,3-diaryl/dihydrobenzofuran moiety (H-7a/H-8a and H-7b/H-8b), in addition to a *cis*-1,2-disubstituted vinyl group ( $J$  = 12.2 Hz, H-7c/H-8c). These NMR data are consistent with a new stereoisomer of miyabenol C.<sup>14,16</sup> The relative stereochemistry of C-7a/C-8a and C-7b/C-8b was determined by NOESY experiments. Significant NOE correlations H-7b/H-14b and H-8b/H-2b(6b) indicated the 7b,8b *trans*-stereochemistry of (**3**). The strong NOE correlation between H-7a and H-8a associated with a moderate NOE correlation H-8a/H-8b indicated the *cis* relationship of 7a/8a. The coupling constants  $J$ (7a,8a) = 7.8 Hz and  $J$ (7b,8b) = 6.9 Hz are consistent with this uncommon *cis*-stereochemistry.<sup>14</sup>

### (*E*)-*cis*-Miyabenol C (**2**)

The positive ESI-HRMS mass spectrum of (**2**) revealed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  679.1942 [M-H]<sup>-</sup> consistent with that

**Table 2.** Inhibition of amyloid  $\beta$  fibril formation

Compound	Inhibition (%)	EC <sub>50</sub> ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
Curcumin	55 $\pm$ 9	—
<b>1</b> Vitisinol C	63 $\pm$ 9	5 $\pm$ 3
<b>2</b> (E)-cis-Miyabenol C	28 $\pm$ 8	—
<b>3</b> (Z)-cis-Miyabenol C	19 $\pm$ 5	—

of a resveratrol trimer. The structure of (**2**) was elucidated by 1D- and 2D-NMR analysis (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). NMR data were in agreement with the structure of (E)-cis-miyabenol C (**2**) previously identified in *Vitis vinifera* leaves.<sup>14</sup> This is the first report in grapevine shoot extract.

#### Vitisinol C (**1**)

The positive ESI-HRMS mass spectrum of (**1**) revealed a quasi-molecular ion peak at  $m/z$  427.1527 [M–H]<sup>–</sup> consistent with that of a resveratrol dimer. The structure of (**1**) was elucidated by 1D- and 2D-NMR analysis (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). NMR data were in agreement with the structure of vitisinol C (**1**) previously identified in *Vitis thunbergii*.<sup>18</sup> This is the first report in *Vitis vinifera* extract.

#### Activity against amyloid- $\beta$

The newly isolated compounds from *Vitis vinifera* shoot extract were tested for their anti-aggregative activity against amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) fibril formation.  $A\beta$  aggregation induces the formation and deposition of senile plaques and neurofibrillary tangles that promote pro-inflammatory responses and activate neurotoxic pathways, leading to dysfunction and death of brain cells in Alzheimer's disease.<sup>19,20</sup> Thus, finding molecules to prevent the aggregation of  $A\beta$ , such as phenolic compounds, could be of therapeutic value.<sup>21</sup> The inhibitory effects against  $A\beta$  aggregation are shown in Table 2. Only vitisinol C showed potent anti-aggregative activity greater than that of curcumin used as positive control, with an EC<sub>50</sub> value of 5  $\pm$  3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As observed in our previous studies, stilbene dimers could be important molecules for therapeutic development in Alzheimer's disease.<sup>11</sup> The inhibitory activity seems to decrease as the molecular weight increases. *Vitis vinifera* shoot extract could be considered as a source of potent putative neuroprotective agents. Nevertheless their beneficial and adverse effects *in vivo* need to be evaluated, since the bioavailability and bioefficacy of these compounds is still not known.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

NMR and MS experiments were undertaken at the Metabolome Facility of Bordeaux Functional Genomic Center, Bordeaux, France.

#### SUPPORTING INFORMATION

Supporting information may be found in the online version of this article.

#### REFERENCES

- Pawlus AD, Waffo-Tégou P, Shaver J and Mérillon JM, Stilbenoid chemistry from wine and the genus *vitis*, a review. *J Int Sci Vigne Vin* **46**:57–111 (2011).

- Vergara C, von Baer D, Mardones C, Wilkens A, Wernekink K, Damm A, et al., Stilbene levels in grape cane of different cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J Agric Food Chem* **60**:929–933 (2012).
- Rimando AM and Suh N, Biological/chemopreventive activity of stilbenes and their effect on colon cancer. *Planta Med* **74**:1635–1643 (2008).
- Waffo-Tégou P, Krisa S, Richard T and Mérillon JM, Grapevine stilbenes and their biological effects, in *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, ed. by Ramawat KG and Mérillon JM. Springer, Berlin, pp. 25–54 (2008).
- Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D and Borderie D, Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie* **94**:269–276 (2012).
- Vang O, Ahmad N, Baile CA, Baur JA, Brown K, Csiszar A, et al., What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE* **6**:e19881 (2011).
- Anekonda TS, Resveratrol: A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* **52**:316–326 (2006).
- Richard T, Pawlus AD, Iglésias ML, Pedrot E, Waffo-Tégou P, Mérillon JM, et al., Neuroprotective properties of resveratrol and derivatives. *Ann NY Acad Sci* **1215**:103–108 (2011).
- Rivière C, Richard T, Quentin L, Krisa S, Mérillon JM and Monti JP, Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's  $\beta$ -amyloid fibrils *in vitro*. *Bioorg Med Chem* **15**:1160–1167 (2007).
- Feng Y, Wang XP, Yang SG, Wang YJ, Zhang X, Du XT, et al., Resveratrol inhibits  $\beta$ -amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *NeuroToxicology* **30**:986–995 (2009).
- Rivière C, Papastamoulis Y, Fortin PY, Delchier N, Andriamanarivo S, Waffo-Tégou P, et al., New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorg Med Chem Lett* **20**:3441–3443 (2010).
- Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglésias M-L, Krisa S, et al., Protective effect of epsilon-viniferin on  $\beta$ -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg Med Chem* **19**:3152–3155 (2011).
- Müller C, Ullmann K, Wilkens A, Winterhalter P, Toyokuni S and Steinberg P, Potent antioxidative activity of Vineatrol®30 grapevine-shoot extract. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**:1831–1836 (2009).
- Mattivi F, Vrhovsek U, Malacarne G, Masuero D, Zulini L, Stefanini M, et al., Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling Å Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J Agric Food Chem* **59**:5364–5375 (2011).
- Brizuela L, Dayon A, Doumerc N, Ader I, Golzio M, Izard J-C, et al., The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. *FASEB J* **24**:3882–3894 (2010).
- Macke S, Jerz G, Empl MT, Steinberg P and Winterhalter P, Activity-guided isolation of resveratrol oligomers from a grapevine-shoot extract using countercurrent chromatography. *J Agric Food Chem* **60**:11919–11927 (2012).
- Romain C, Gaillet S, Carillon J, Vidé J, Ramos J, Izard J-C, et al., Vineatrol and cardiovascular disease: Beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *J Agric Food Chem* **60**:11029–11036 (2012).
- Chiou W-F, Shen C-C, Chen C-C, Lin C-H and Huang Y-L, Oligostilbenes from the roots of *Vitis thunbergii*. *Planta Med* **75**:856–859 (2009).
- Sisodia SS and Price DL, Role of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *FASEB J* **9**:366–370 (1995).
- Gandy S, The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **115**:1121–1129 (2005).
- Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, et al., Phenolic compounds prevent amyloid  $\beta$ -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding. *J Biol Chem* **287**:14631–14643 (2012).

## Perspectives principales

Les résultats très intéressants concernant les études pharmacologiques *in vitro* des stilbènes que nous avons isolés des différentes Cypéracées vont nous permettre d'écrire un nouvel article scientifique. Le carexinol A, la nouvelle molécule que nous avons isolée de *Carex cuprina*, a une forte activité anti-amyloïde. Il arrive notamment à bien protéger des cellules neuronales en culture *in vitro*. Ce travail mérite donc d'être poursuivi sur d'autres modèles pharmacologiques.

Dans l'optique, d'étudier les molécules chez l'animal, il faudra produire des quantités importantes. La technique CPC, avec l'appareil de 1L que possède le laboratoire, sera très utile.

Dès le début de nos travaux, nous avons observé que les parties aériennes chlorophylliennes des plantes sur lesquelles nous avons travaillé n'étaient pas très riches en stilbènes et que les chromatogrammes réalisés à partir de leurs extraits étaient trop complexes pour arriver rapidement à isoler des molécules pures. Nous nous sommes donc focalisés d'abord sur les parties souterraines qui étaient très riches. Hélas, ceci implique l'arrachage des plantes. Nous avons donc pensé à essayer d'initier des cultures *in vitro* de racines de *Carex* afin de s'affranchir des récoltes et des aléas de la météorologie et des cultures en milieu naturel. Nos quelques essais au cours de notre Thèse furent infructueux, nous avons systématiquement des infections dans les cultures d'explants primaires. Nous avons donc mis de côté cette piste mais il serait très intéressant de reprendre ce travail. Nous pourrions avoir ainsi des cultures *in vitro* de *Carex* toujours disponibles pour des extractions et purifications de stilbènes complexes.

Nos quelques travaux sur les graines ont, à l'opposé des parties aériennes chlorophylliennes, donné des résultats intéressants en terme de production de stilbénoïdes. Il faudra donc approfondir cette voie de recherche et étendre ces travaux sur les graines sur de plus nombreuses espèces de Cypéracées.

Le travail sur les parties aériennes chlorophylliennes méritera aussi d'être approfondi. Malgré des signaux faibles et des "forêts de pics" sur les chromatogrammes CLHP, nous



avons détecté par CL-Masse la présence de stilbènes dont certains sont les mêmes que ceux trouvés dans les racines. Il faudra améliorer les techniques de pré-purification et de fractionnement des extraits s'il on veut accéder à des molécules pures. On peut espérer que la technique de CPC pourra être un atout très appréciable pour cela.

Concernant nos analyses sur les vins tunisiens, nous avons retrouvé déjà plusieurs stilbénoides complexes intéressants et avons pu établir leur concentration dans certains vins. Le vin Sidi Zahia a donné les meilleurs résultats. Nous retrouvons dans ce vin par exemple, du piceatanol, de l' $\epsilon$ -viniférine, de l' $\alpha$ -viniférine, de l'hopéaphénol et de l'isopéaphénol. Nous n'avons pas pu hélas obtenir d'autres vins de Tunisie. Il serait très intéressant d'étendre notre analyse à un nombre beaucoup plus important de vins tunisiens venant d'un plus grand nombre d'appellations.

En terme de rendement analytique, l'arrivée très récente au laboratoire d'une chaîne UPLC couplée au spectromètre de Masse est une véritable révolution. En effet, cet appareil permet de diviser par 4 ou 6 environ les temps d'analyse pour un échantillon et d'accélérer ainsi le screening de nombreux échantillons. Nous n'avons utilisé cette technique UPLC-Masse que très peu lors de notre thèse mais elle nous a bien servi pour la détection de la présence des stilbènes dans les vins tunisiens. Les dosages des stilbènes ont par contre été réalisés par CLHP-DAD classique.

### **Perspectives en terme d'articles scientifiques :**

Deux rédactions d'articles sont en cours.

La première concerne les travaux d'études pharmacologiques *in vitro*.

La seconde concerne mes analyses sur les teneurs en stilbénoides des vins tunisiens.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

**Abdel-Mogib M., Basaif S.A. et Sobahi T.R. (2001).** Stilbenes and a new acetophenone derivative from *Scirpus holoschoenus*. *Molecules*, **6**(8): 663-667.

**Adrian M., Jeandet P., Veneau J., Weston L.A. et Bessis R. (1997).** Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology*, **23**(7): 1689-1702.

**Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S. et Takada Y. (2004).** Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, **24**: 2783-2840.

**Alberts D.S., Colvin O.M., Conney A.H., Ernster V.L., Garber J.E. et Greenwald P. (1999).** Prevention of cancer in the next millennium : Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res.*, **59** : 4743-4758.

**Andre P. et Renimel I. (2007).** Protecting and regenerating composition. *Brevet LVMH US* 2007/0243148 A1.

**Andriambeloson E., Kleschyov A.L., Muller B., Beretz A., Stoclet J.C. et Andriantsitohaina R. (1997).** Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **120**: 1053-1058.

**Auger C., Kim J.H., Chabert P., Chaabi M., Anselm E., Lanciaux X., Lobstein A. et Schni-Kerth V.B. (2010).** The EGCg-induced redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase and relaxation are critically dependent on hydroxyl moieties. *Biochemistry Biophysic Research Communication*, **393**: 162-167.

**Bamforth C.W. (1999).** Beer haze. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, **57**: 81-90.

**Barcelo A.R., Pomar F., Matías López-Serrano M. et Pedreño M.A. (2003).** Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology*, **30**(6): 577-591.

**Basaif S.A. (2003).** Further flavans and stilbenes from *Cyperus conglomeratus*. *Journal of Saudi Chemical Society*, **7**(2): 259-262.

**Beaudeau J., Delattre J., Therond P., Bonnefont-Rousselot D., Legrand A. et Peynet J. (2006).** Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **21**(3): 144-150.

- Bertelli A.A., Giovannini L., Giannessi D., Migliori M., Bernini W., Fregoni M. et Bertelli A. (1995).** Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *International Journal of Tissue Reactions*, **17**(1): 1-3.
- Bertelli A.A. et Das DK. (2009).** Grapes, wines, resveratrol and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol*, **54**(6): 468-476.
- Berthod A. et Carda-Broch S. (2004).** Determination of liquid-liquid partition coefficients by séparation methods. *Journal of Chromatography A*, **1037**(1-2): 3-14.
- Bhat K.P.L., Kosmeder J.W. et Pezzuto J.M. (2001).** Biological effects of resveratrol. *Antioxidant Redox Signal.*, **3**(6): 1041-1064.
- Block G., Patterson B. et Subar, A. (1992).** Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, **18**(1): 1-29.
- Block M.L. et Hong J. (2005).** Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology*, **76**(2): 77-98.
- Bokvist M., Lindström F., Watts A. et Gröbner G. (2004).** Two types of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *Journal of Molecular Biology*, **335**(4): 1039-1049.
- Bowles D., Isayenkova J., Lim E.K. et Poppenberger B. (2005).** Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**(3): 254-263.
- Brat P., Georgé S., Bellamy A., Du Chaffaut L., Scalbert A., Mennen L., Arnault N. et Amiot M.J. (2006).** Daily Polyphenol Intake in France from Fruit and Vegetables. *Journal of Nutrition*, **136**(9): 2368-2373.
- Bryant J.P., Wieland G.D., Reichardt P.B., Lewis V.E. et McCarthy M.C. (1983).** Pinosylvins methyl ether deters snowshoe hare feeding on green alder. *Science*, **222**(4627): 1023-1025.
- Burns J., Gardner P.T., O'Neil J., Crawford S., Morecroft I., McPhail D.B., Lister C., Matthews D., Maclean M.R., Lean M.E.J., Duthie G.G. et Crozier A. (2000).** Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(2): 220-230.
- Berthod A. et Carda-Broch S. (2004).** Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *Journal of Chromatography A*, **1037**(1-2): 3-14.
- Chabert P., Fougèrouse, A. et Brouillard, R. (2006).** Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene. *BioFactors*, **27**(1-4): 37-46.
- Chau N.M., Hanh T.T.H., Luyen N.T., Minh C.V. et Dat Nguyen Tien. (2013).** Flavanones and stilbenes from *Cyperus stoloniferus* Retz. *Biochemical Systematics and Ecology*, **50**: 220-222.

- Chen C., Jang J., Li M. et Surh Y. (2005).** Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **331**(4): 993-1000.
- Chong J., Poutaraud A. et Hugueney P. (2009).** Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science*, **177**(3): 143-155.
- Clifford A.J., Ebeler S.E., Ebeler J.D., Bills N.D., Hinrichs S.H., Teissedre P.L. et Waterhouse A.L. (1996).** Delayed tumor onset in transgenic mice fed an amino acid-based diet supplemented with red wine solids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**(5) : 748-756.
- Conte A., Pellegrini S. et Tagliazucchi D. (2003).** Synergistic protection of PC12 cells from beta-amyloid toxicity by resveratrol and catechin. *Brain Research Bulletin*, **29**(5-6): 243-255.
- Creasy, L.L. et Coffee, M. (1988).** Phytoalexin production potential of grape berries. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **113**(2): 230-234.
- Crouch P.J., Harding S.E., White A.R., Camakaris J., Bush A.I. et Masters C.L. (2008).** Mechanisms of A[beta] mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **40**(2): 181-198.
- D'Abrosca B., Fiorentino, A., Golino A., Monaco P., Oriano P., Pacifico S. (2005).** Carexanes: prenyl stilbenoid derivatives from *Carex distachya*. *Tetrahedron Letters*, **46**(32): 5269-5272.
- Dawidar A.M., Jakupovic J., Abdel-Mogib M. et Mashaly I.A. (1994).** Prenylstilbenes and prenylflavanones from *Schoenus nigricans*. *Phytochemistry*, **36**(3): 803-806.
- Delmas D., Lançon A., Colin D., Jannin B. et Latruffe N. (2006).** Resveratrol as a chemopreventive agent: A promising molecule for fighting cancer. *Current Drug Targets*, **7**(4), 423-442.
- Demrow H.S., Slane P.R. et Folts J.D. (1995).** Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*, **91**(4): 1182-1188.
- Dixon R.A. et Paiva N.L. (1995).** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*, **7**(7): 1085.
- Donnez D., Jeandet P., Clément C. et Courot E. (2009).** Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, **27**(12): 706-713.
- Dumery L., Bourdel F., Soussan Y., Fialkowsky A., Viale S., Nicolas P. et Reboud-Ravaux M. (2001).**  $\beta$ -Amyloid protein aggregation: its implication in the physiopathology of Alzheimer's disease. *Pathology Biology*, **49**(1): 72-85.
- Ehlting J., Hamberger B., Million-Rousseau R. et Werck-Reichhart D. (2006).** Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Review*, **5**: 239-270.

**Elattar T.M.A. et Virji A.S. (1999).** Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anti-Cancer Drug*, **10**(2) : 187-193.

**Ezzili B., Darné G. et Bejaoui M. (1999).** Achievement of anthocyanins production in grape leaves of Carignan (*Vitis vinifera* L.) exits of one eye cuttings cultivated in laboratory [Mise au point d'une technique de production d'anthocyanes dans les feuilles de boutures à un œil de Carignan (*Vitis vinifera* L.) cultivées au laboratoire]. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **33**(1): 9-18.

**Feng Y., Wang XP., Yang SG., Wang YJ., Zhang X., Du XT. et al. (2009).** Resveratrol inhibits  $\beta$ -amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. *Neurotoxicology*, **30**: 986-995.

**Ferrer J.L., Austin M.B., Stewart C.Jr. et Noel J.P. (2008).** Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**(3): 356-370.

**Fiorentino A., D'Abrosca B., Izzo A., Pacifico S. et Monaco P. (2006a).** Structural elucidation and bioactivity of novel secondary metabolites from *Carex distachya*. *Tetrahedron Letters*, **62**(14): 3259-3265.

**Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Natale A. et Monaco P. (2006b).** Structures of bioactive carexanes from the roots of *Carex distachya* Desf. *Phytochemistry*, **67**(10): 971-977.

**Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Iacovino R., Mastellone C., Di Blasio B. et Monaco P. (2006c).** Distachyasin: A new antioxidant metabolite from the leaves of *Carex distachya*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **16**(23): 6096-6101.

**Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Iacovino R., Izzo A., Uzzo P., Russo A., Di Blasio B. et Monaco P. (2008a).** Carexanes from *Carex distachya* Desf.: Revised stereochemistry and characterization of four novel polyhydroxylated prenylstilbenes. *Tetrahedron Letters*, **64**(33): 7782-7786.

**Fiorentino A., D'Abrosca B., Pacifico S., Izzo A., Letizia M., Esposito A. et Monaco P. (2008b).** Potential allelopathic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**(9): 691-698.

**Fiorentino A., Ricci A., D'Abrosca B., Pacifico S., Golino A., Letizia M., Piccolella S. et Monaco P. (2008c).** Potential food additives from *Carex distachya* roots: identification and *in vitro* antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(17): 8218-8225.

**Fitzpatrick D.F., Hirschfield S.L. et Coffey R.G. (1993).** Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *American Journal of Physiology*, **265**: 774-778.

**Foucault A.P. et Chevolut L. (1998).** Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. *Journal of Chromatography A*, **808**: 3-22.

**Frankel E.N., Waterhouse A.L. et Kinsella J.E. (1993).** Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, **341**(8852): 1103-1104.

**Frota Madeira S.V., Auger C., Anselm E., Chataigneau M., Chataigneau T., Soares de Mour R. et Schini-Kerth V.B. (2009).** eNOS activation induced by polyphenol-rich grape skin extract in porcine coronary arteries. *Journal of Vascular Research*, **46**: 406-416.

**Fuhrman B., Lavy A. et Aviram M. (1995).** Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *American Journal of Clinical Nutrition*, **61**: 549-554.

**Gachon C.M.M., Langlois-Meurinne, M. et Saindrenan, P. (2005).** Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science*, **10**: 542-549.

**Gagné S. (2007).** Implication de l'équilibre hormonal dans les mécanismes de maturation phénolique du raisin : étude du rôle de l'acide abscissique sur la composition et la biosynthèse des tanins de la pellicule. *Thèse de Doctorat d'Université*, Bordeaux, France.

**Gatto P., Vrhovsek U., Muth J., Segala C., Romualdi C., Fontana P., Pruefer D., Stefanini M., Moser C., Mattivi F., Velasco R., Gatto P., Vrhovsek U., Muth J., Segala C., Romualdi C., Fontana P., Pruefer D., Stefanini M., Moser C. et al. (2008).** Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 11773-11785.

**González-Sarriás, A., Gromek, S., Niesen, D., Seeram, N.P. et Henry G.E. (2011).** Resveratrol oligomers isolated from carex species inhibit growth of human colon tumorigenic cells mediated by cell cycle arrest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(16): 8632-8638.

**Gotez G., Fkyerata A., Métais N., Kunza M., Tabacchia R., Pezet R. et Pont V. (1999).** Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinera* stilbene oxidase. *Phytochemistry*, **52**(5): 759-767.

**Gronbaek M., Becker U., Johansen D., Gottschau A., Schnohr P., Hein H.O., Jensen G. et Sørensen T.I.A. (2000).** Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Annals of Internal Medicine*, **133**(6), 411-419.

**Gronbaek M., Deis A., Sorenson T.I.A., Becker U., Schnohr P. et Jensen G. (1995).** *British Medical Journal*, **310**: 1165-1169.

**Guidoni S., Mannini F., Ferrandino A., Argamante N. et Di Stefano R. (1997).** The effect of grapevine leafroll and rugose wood sanitation on agronomic performance and berry and leaf phenolic content of a Nebbiolo clone (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture*, **48**(4): 438-442.

**Hahlbrock K. et Scheel D. (1989).** Biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, **40**: 347-369.

- Hart J.H. (1981).** Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **19**: 437-458.
- Hirsch E. (2012).** Future drug targets for Parkinson's disease. *Bull. Acad. Natle Méd.*, **196**(7) :1369-1379.
- Ijima K., Yoshizumi M., Hashimoto M., Kim S., Eto M., Ako J., Liang Y.Q., Sudoh N., Hosoda K., Nakahara K., Toba K. et Ouchi Y. (2000).** Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, **101** : 805-811.
- Ioset J.R., Marston A., Gupta M.P. et Hostettmann K. (2001).** Five new prenylated stilbenes from the root bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal of Natural Products*, **64**(6): 710-715.
- Ito T., Endo H., Oyama M. et Iinuma M. (2012).** Novel isolation of stilbenoids with enantiomeric and meso forms from a *Cyperus* rhizome. *Phytochemistry Letters*, **5** : 267-270. .
- Ito T., Endo H., Shinohar H., Oyama M., Akao Y. et Iinuma M. (2012).** Occurrence of stilbene oligomers in *Cyperus* rhizomes. *Fitoterapia*, **83**(8): 1420-1429.
- Jaillon O., Aury J.M., Noel B. et al. (2007).** The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, **449**(7161): 463-467.
- Jang M. et Pezzuto J.M. (1998).** Resveratrol blocks eicosanoid production and chemically-induced cellular transformation : Implications for cancer chemoprevention. *Pharmaceutical Biology*, **36** : 28-34.
- Jang J. et Surh Y. (2003).** Protective effect of resveratrol on [beta]-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, **34**(8): 1100-1110.
- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C. et Pezzuto J.M. (1997).** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**(5297): 218-220.
- Jang M.H., Piao X.L., Kim H.Y., Cho E.J., Baek S.H. et Kwon S.W. (2007).** Resveratrol oligomers from *Vitis amurensis* attenuate beta-amyloid-induced oxidative stress in PC12 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **30**(6): 1130-1134.
- Jeandet P., Bessis R. et Gautheron B. (1991).** The Production of Resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, **42**: 41-46.
- Jeandet P., Bessis R., Sbaghi M. et Meunier P. (1995).** Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to Botrytis attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*, **143**(3): 135-139.



- Jeandet P., Delaunois B., Conreux A., Donnez D., Nuzzo V., Cordelier S., Clément C. et Courot E. (2010).** Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *Biofactors*, **36**(5): 331-341.
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. et Adrian M. (2002).** Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2731-2741.
- Joseph J.A., Shukitt-Hale B., Brewer G.J., Weikel K.A., Kalt W. et Fisher D.R. (2010).** Differential protection among fractionated blueberry polyphenolic families against DA-, Abeta(42)- and LPS-induced decrements in Ca(2+) buffering in primary hippocampal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(14): 8196-8204.
- Karamac M., Kosicska A. et Pegg R.B. (2005).** Comparaison of radical scavenging activities for selected phenolic acids. *J. Food Nutr. Sci.*, **14**(2) : 165-170.
- Kawabata J., Ichikawa S., Kurihara H. et Mizutani J. (1989).** Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex kobomugi* Ohwi (Cyperaceae). *Tetrahedron Letters*, **30**(29): 3785-3788.
- Kawabata J., Mishima M., Ichikawa S., Kurihara H., Masato H., Fukushi E. et Mizutani J. (2009).** Structural studies on oligostilbenes in *Carex pumila* Thunb. *Symposium on the Chemistry of Natural Products*, **33**: 581-588.
- Kawabata J., Mishima M., Kurihara H. et Mizutani J. (1991).** Kobophenol B, a tetrastilbene from *Carex pumila*. *Phytochemistry*, **30**(2): 645-647.
- Kawabata J., Mishima M., Kurihara H. et Mizutani J. (1995).** Stereochemistry of two tetrastilbenes from *Carex* species. *Phytochemistry*, **40**(5): 1507-1510.
- Kim H.J., Lee K.W. et Lee H.J. (2007).** Protective effects of piceatannol against beta-amyloid-induced neuronal cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1095**: 473-482.
- Kingston D.G.I. (2009).** Tubulin-Interactive Natural Products as Anticancer Agents. *Journal of Natural Production*, **72**(3): 507-515.
- Klurfeld D.M. et Kritchevsky D. Differential effects of alcoholic beverages on experimental atherosclerosis in rabbits. (1981).** *Exp. Mol. Pathol.*, **34**(1) : 62-71.
- Koeppen B. et Basson D. (1996).** The anthocyanin pigments of Barlinka grappes. *Phytochemistry*, **5**(1): 183-187.
- Kopp P. (1998).** Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *European Journal of Endocrinology*, **138**(6): 619-620.

**Kundu J.K. et Surh Y. (2008).** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*, **269**(2): 243-261.

**Kurihara H., Kawabata J., Ichikawa S. et Mizutani J. (1990).** (-)- $\epsilon$ -Viniferin and related oligostilbenes from *Carex pumila* Thunb. (Cyperaceae). *Journal of Agricultural and Biological Chemistry*, **54**(4): 1097-1099.

**Kurihara H., Kawabata J., Ichikawa S., Mishima, M. et Mizutani J. (1991).** Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochemistry*, **30**(2): 649-653.

**Lacampagne S. (2010).** Localisation et caractérisation des tanins dans la pellicule du raisin : impact de l'organisation physio-chimique des parois cellulaires sur la composante tannique, la qualité du fruit et la typicité des raisins de Bordeaux. *Thèse de Doctorat d'Université*, Bordeaux, France.

**Lambert C. (2011).** Etude du rôle des stilbènes dans les défenses de la vigne contre les maladies du bois. *Thèse de Doctorat d'Université*, Bordeaux, France.

**Langcake P. et Pryce R. (1976).** The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology*, **9**(1): 77-86.

**Larronde F., Richard T., Delaunay J.C., Decendit A., Monti J.P., Krisa S. et Mérillon J.M. (2005).** New stilbenoid glucosides isolated from *Vitis vinifera* cell suspension cultures (cv. Cabernet Sauvignon). *Planta Medica*, **71**(9): 888-890.

**Lee S.H., Shin N.H., Kang S.H., Park J.S., Chung, S.R., Min K.R et Kim Y. (1998).**  $\alpha$ -Viniferin: A prostaglandin H2 synthase inhibitor from root of *Carex humilis*. *Planta Medica*, **64**(3): 204-207.

**Li, L., Henry G.E. et Seeram N.P. (2009).** Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**(16): 7282-7287.

**Liang Q.L., Lei L.L., Cui X., Zou N.S. et Duan J.A. (2013).** Bioactive cis-stilbenoids from the tubers of *Scirpus yagara*. *Fitoterapia*, **84**: 170-173.

**Likhtenshtein G. (2009).** Stilbenes: Applications in chemistry, Life Sciences and Materials Sciences. *John Wiley and Sons ed., ISBN: 978-352732388-3 DOI: 10.1002/9783527628087*.

**Lim G.P., Chu T., Yang F., Beech W., Frautschy S.A. et Cole G.M. (2001).** The curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse. *Journal of Neuroscience*, **21**: 8370-8377.

**Lin L.L., Lien C.Y., Cheng Y.C. et Ku K.L. (2007).** An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **853**(1-2): 175-182.

**Longnecker M.P., Newcomb P.A., Mittendorf R., Greenbreg E.R., Clapp R.W., Bogdan G.F., Baron J., MacMahon B. et Willett C.W. (1995).** Risk of breast cancer in relation to lifetime alcohol consumption. *J.Natl. Cancer I.*, **87** : 923-929.

**Losa G.A. (2003).** Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *European Journal of Clinical Investigation*, **33**: 818-823.

**Luque-Rodriguez JM., Pérez-Juan P. et Luque de Castro MD. (2006).** Extraction of polyphenols from vine shoots of *Vitis vinifera* by superheated ethanol-water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23**: 8775-8781.

**Leopoldini M., Russo N., Chiodo S. et Toscano M. (2006).** Iron chélation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *Agricultural and Food Chemistry*, **45** : 6343-6351.

**Lynn D.G. et Meredith S.C. (2000).** Model peptides and the physicochemical approach to  $\beta$ -Amyloids. *Journal of Structural Biology*, **130**: 153-173.

**MacDonald M.J. et D'Cunha G.B. (2007).** A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, **85**: 273-282.

**Macfarlane G.J., Zheng T., Marshall J.R., Boffetta P., Niu S., Brasure J., Merletti F. et Boyle P. (1995).** Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *European Journal of Cancer*, **31**(3): 181-187.

**Mgbonyebi O.P., Russo J. et Russo I.H. (1998).** Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast épithélial cells. *Int. J. Oncol.*, **12**(4) : 865-869.

**Mandel S. et Youdim M. (2004).** Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**: 304-317.

**Martinez J. et Moreno J.J. (2000).** Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, **59**(7): 865-870.

**Mattivi F., Vrhovsek U., Malacarne G., Masuero D., Zulini L., Stefanini M., Moser C., Velasco R. et Guella G. (2011).** Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling  $\times$  Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(10): 5364-5375.

**Meng Y., Bourne P., Whiting P., Sik V. et Dinan L. (2001).** Identification and ecdysteroid antagonist activity of three oligostilbenes from the seeds of *Carex pendula* (Cyperaceae). *Phytochemistry*, **57**(3): 393-400.

**Mérillon J.M., Fauconneau B., Waffo Teguo P., Barrier L., Vercauteren J. et Huguet F. (1997).** Antioxidant Activity of the Stilbene Astringin, Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *Clinical Chemistry*, **43**(6): 1092-1093.

- Morales M., Ros Barcelo A. et Pedreno M.A. (2000).** Plant stilbenes: recent advances in their chemistry and biology. *Advance in Plant Physiology*, **3**: 39-70.
- Morikawa T., Xu F., Matsuda H. et Yoshikawa M. (2002).** Structures and radical scavenging activities of novel norstilbene dimer, longusone A, and new stilbene dimers, longusols A, B, and C, from Egyptian herbal medicine *Cyperus longus*. *Heterocycles*, **57**(11): 1983-1988.
- Morikawa T., Xu F., Matsuda H. et Yoshikawa M. (2010).** Structures of novel norstilbene dimer, longusone A, and three new stilbene dimers, longusols A, B, and C, with antiallergic and radical scavenging activities from Egyptian natural medicine *Cyperus longus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **58**(10): 1379-1382.
- Molyneux P. (2004).** The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J. Sci. Technol*, **26** (2), 211-219.
- Mucke L. (2009).** Neuroscience: Alzheimer's disease. *Nature*, **461**(7266): 895-897.
- Mucke L., Masliah E., Yu G.Q., Mallory M., Rockenstein E.M., Tastuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K. et McConlogue L. (2000).** High-level neuronal expression of a beta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *Journal of Neuroscience*, **20**(11): 4050-4058.
- Nakajima K., Taguchi H., Endo T. et Yoshioka I. (1978).** The constituents of *Scirpus fluviatilis* (Torr.) A. Gray. I. The structures of two new hydroxystilbene dimers, scirpusin A and B. *Chem. Pharm. Bull.*, **26**(10): 3050-3057.
- Niesen D., Gonzalez-Sarrias A., Yuan T., Henry G.E. et Seeram, N.P. (2012).** Bioassay-guided isolation of cytotoxic constituents from *Carex vulpinodea* seeds. Abstracts of Papers, 244th ACS National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, United States, August 19-23 AGFD-152.
- Noel J.P., Dixon R.A., Pickersky E., Zubieta C. et Ferrer J.L. (2003).** Structural, Functional, and Evolutionary Basis for Methylation of Plant Small Molecules. *Recent Advances in Phytochemistry*, **37**: 37-58.
- Nozaki H., Hayashi H., Hayashi K., Ohira S., Ikeda S., Iinuma M., Tanaka T., Ohyama M., Tsutsui K., Takaoka D. et Yamada M. (1997).** Plant polyphenols exhibiting DNA topoisomerase II inhibition. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu*, **39**: 571-576.
- Ono K., Hazuhiro H., Naiki H. et Yamada M. (2004).** Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid fibrils *in vitro*. *Journal of Neuroscience Research*, **75**: 742-750.
- Orgogozo J.M., Dartigues J.F., Lafont S., Letenneur L., Commenges D., Salamon R., Renaud S. et Breteler M.B. (1997).** Wine consumption and dementia in the elderly: a prospective community study in the Bordeaux area. *Revue Neurologique* **153**: 185-192.

- Pawlus A., Waffo-Tégou P. et Mérillon J.M. (2011).** Stilbenoid Chemistry from Wine and the Genus *Vitis*, *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.*, **46**(2) : 57-111.
- Peer W.A., Brown D.E., Tague B.W., Muday G.K., Taiz L., Murphy A.S. (2001).** Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**(2): 536-548.
- Pezet R. et Pont V. (1988).** Identification of pterostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **26**(5): 603-607.
- Poutaraud A., Latouche G., Martins S., Meyer S., Merdinoglu D. et Cerovic Z.G. (2007).** Fast and local assessment of stilbene content in grapevine leaf by in vivo fluorometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 4913-4920.
- Powell R.G., Bajaj R. et McLaughlin J.L. (1987).** Bioactive stilbenes of *Scirpus maritimus*. *Journal of Natural Products*, **50**(2): 293-296.
- Renaud S. et De Lorgeril, M. (1992).** Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, **339**(8808): 1523-1526.
- Renaud S. et Gueguen R. (1998).** The French paradox and wine drinking. *Novartis Foundation Symposium*, **216**: 208-222.
- Ribéreau-Gayon P. (1965).** Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *V. vinifera*. *Comptes Rendus d'Académie des Sciences Série D*, **260**: 341-343.
- Rivière C., Delaunay J., Immel F., Cullin C. et Monti J. (2009).** The polyphenol piceid destabilizes preformed amyloid fibrils and oligomers *in vitro*: hypothesis on possible molecular mechanisms. *Neurochemical Research*, **34**(6): 1120-1128.
- Rivière C., Papastamoulis Y., Fortin P.Y., Delchier N., Andriamanarivo S., Waffo-Tégou P., Kapche G.D.W.F., Amira-Guebalia H., Delaunay J.C., Mérillon J.M., Richard T. et Monti J.P. (2010).** New stilbene dimers against amyloid fibril formation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **20**(11): 3441-3443.
- Rivière C., Pawlus A.D. et Mérillon J.M. (2012).** Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Natural Product Reports*, **29**: 1317-1333.
- Rivière C., Richard T., Quentin L., Krisa S., Mérillon J.M., Monti J.P. (2007).** Inhibitory activity of stilbenes on Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **15**(2): 1160-1167.
- Rodriguez-Mateos A., Vauzour D., Krueger C.G., Shanmuganayagam D., Reed J., Calani L., Mena P., Del Rio D. et Crozier A. (2014).** Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update. *Archives of Toxicology*, **88**: 1803-1853.

- Roupe K.A., Remsberg C.M., Yáñez J.A. et Davies N.M. (2006).** Pharmacometrics of stilbenes: segueing towards the clinic. *Current Clinical Pharmacology*, **1**: 81-101.
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Tec & Doc Lavoisier Editions, ISBN 2-7430-0805-9.
- Schmeda-Hirshmann G., Gutiérrez M.I., Loyola J.I., Zúñiga J. (1996).** Biological Activity and Xanthine Oxidase Inhibitors from *Scirpus californicus* (C. A. Mey.) Steud. *Phytotherapy Research*, **10**(8): 683-685.
- Schmidlin L., Poutaraud A., Claudel P., Mestre P., Prado E., Santos-Rosa M., Wiedemann- Merdinoglu S., Karst F., Merdinoglu D. et Hugueney P. (2008).** A stress-inducible resveratrol *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology*, **148**(3): 1630-1639.
- Schöppner A. et Kindl H. (1984).** Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *The Journal of Biological Chemistry*, **259**: 6806-6811.
- Schröder G., Brown J.W. et Schröder J. (1988).** Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. *FEBS*, **172**: 161-169.
- Seigneur M., Bonnet J., Dorian B., Benchimol D., Drouillet F., Gouverneur G., Larrue J., Crockett R., Boisseau M.R., Ribereau-Gayon P. et Bricaud H. (1990).** Effect of the consumption of alcohol, white wine, and red wine on platelet function and serum lipids. *Journal of Applied Cardiology*, **5**: 215-222.
- Senda N., Kubota Y., Hoshino T., Nozaki H., Hayashi H. et Nakayama M. (1995).** Mass spectra of some stilbene oligomers from *Carex* species. *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, **43**(1): 45-51.
- Shen T., Wang X.N. et Lou H.X. (2009).** Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, **26**: 916-935.
- Siemann E.H. et Creasy L.L. (1992).** Concentration of the Phytoalexin Resveratrol in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **43**: 49-52.
- Sobolev V.S., Potter, T.L. et Horn, B.W. (2006).** Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. *Phytochemical Analysis*, **17**: 312-322.
- Stoclet J.C., Kleschyov A., Andriambelson E., Diebolt M. et Andriantsitohaina R. (1999).** Endothelial NO release caused by red wine polyphenols. *Journal of Physiology and Pharmacology*, **50**(4): 535-540.
- Sushetet M., Siess M.H., Le Bon A.M. et Canivenc-Lavier M.C. (1996).** Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In *Polyphenols 96 – Les Colloques 87*, INRA Editions, ISBN 2-7380-0796-1: 165-204.

**Suzuki K., Shimizu T., Kawabata J et Mizutani J. (1987).** New 3,5,4'-trihydroxystilbene (resveratrol) oligomers from *Carex fedia* Nees var. *miyabei* (Franchet) T. Koyama (*Cyperaceae*). *Agricultural and Biological Chemistry*, **51**(4): 1003-1008.

**Takaoka M. (1939).** On the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes fil.). *Journal of Chem. Society Japan*, **60**: 1261-1264.

**Tarozzi A., Morroni F., Merlicco A., Bolondi C., Teti G., Falconi M., Cantelli-Forti G. et Hrelia P. (2010).** Neuroprotective effects of cyadin 3-*O*-glucopyranoside on amyloid beta (25-35) oligomer-induced toxicity. *Neuroscience Letters*, **473**(2): 72-76.

**Teissèdre P.L. (2012).** Wine and health. in *The Biochemistry of the Grape Berry*, Bentam Science Publishers Editions, ISBN 978-160805540-1: 269-285.

**Torres P., Guillermo Avila J., Romo de Vivar A., García A.M., Marín J.C., Aranda E. et Céspedes C.L. (2003).** Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*, **64**: 463-473.

**Tran H.H.T., Nguyen M.C., Le H.T., Nguyen T.L. Pham T.B., Chau V.M., Nguyen H.N. et Nguyen T.D. (2014).** Inhibitors of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase from *Cyperus rotundus*. *Pharmaceutical Biology*, **52**(1): 74-77.

**Tropf, S., Lanz, T. et Rensing, S.A. (1994).** Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, **38**: 610-618.

**Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. et Dommes J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry*, **113** : 1226-1233.

**Vercauteren J., Castagnino C. et Delaunay J.C. (2003).** Compositions based on Resveratrol. *Brevet Caudalie* US 6,572,882 B1.

**Versari A., Parpinello G.P., Tornielli G.B., Ferrarini R. et Giulivo C. (2001).** Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(11): 5531-5536.

**Vogt T. (2010).** Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, **3**(1): 2-20.

**Wang W., Tang K., Yang H.R., Wen P.F., Zang P., Wang H.L. et Huang Z.D. (2010).** Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**(2-3): 142-152.

**Wang Z., Zou J., Cao K., Hsieh T.C., Huang Y. et Wu J.M. (2005).** Dealcoholized red wine containing known amounts of resveratrol suppresses atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits without affecting plasma lipid levels. *International Journal of Molecular Medicine*, **16**(4): 533-540.

**Waterhouse A.L. et Teissèdre P.L. (1997).** in Watkins T.R.: *Wine Nutritional and Therapeutic Benefit*, ACS Symposium Series Editions, **661**: 12-23.

**Weinreb O., Mandel S., Amit T. et Youdim M. (2004).** Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **15**(9): 506-516.

**WHO MONICA PROJECT (1989).** Objectives and Design. *International Journal of Epidemiology*, **18**(Sup.1): 29-37.

**Yamada M., Hayashi K.I., Hayashi H., Ikeda S., Hoshino T., Tsutsui K., Tsutsui K., Iinuma M. et Nozaki H. (2006).** Stilbenoids of *Kobresia nepalensis* (Cyperaceae) exhibiting DNA topoisomerase II inhibition. *Phytochemistry*, **67**(3): 307-313.

**Yang G., Zhang L. et Chen G. (2010).** Determination of four phenolic compounds in *Scirpus yagara* Ohwi by CE with amperometric detection. *Chromatographia*, **71**(1-2): 143-147.

**Yankner B.A., Dawes L.R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L. et Neve R.L. (1989).** Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, **245**(4916): 417-20.

**Ye J., Meng X., Yan C. et Wang C. (2010).** Effect of purple sweet potato anthocyanins on beta-amyloid-mediated PC-12 cells death by inhibition of oxidative stress. *Neurochemistry Research*, **35**(3): 357-365.



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Polyphénols du vin et santé</b> .....	1
<b>1. Les polyphénols</b> .....	3
1.1. Les flavonoïdes .....	4
1.1.1. Les anthocyanes .....	5
1.1.2. Les flavanols et les tanins .....	5
1.1.3. Les flavonols .....	6
1.2. Les non-flavonoïdes .....	7
1.2.1. Les acides phénols .....	7
1.2.2. Les stilbènes .....	8
<b>2. Description générale des stilbènes</b> .....	9
2.1. La voie de biosynthèse des stilbènes.....	11
2.1.1. Les monomères .....	11
2.1.2. Les oligomères .....	15
2.1.3. Les dérivés des stilbènes .....	17
2.1.3.1. Isomérie.....	17
2.1.3.2. Glycosylation .....	17
2.1.3.3. Méthoxylation .....	18
2.1.3.4. Prénylation .....	19
<b>3. Les activités biologiques des stilbènes</b> .....	21
3.1. Le rôle en santé humaine .....	21
3.1.1. Les effets antioxydants.....	21
3.1.2. Les effets biologiques au niveau neurologique.....	22
3.1.3. Les effets bénéfiques vis-à-vis du cancer .....	26
3.1.4. Les effets biologiques au niveau cardiovasculaire.....	27
3.2. Le rôle des stilbènes en santé végétale.....	29

3.2.1. Les effets antifongiques et allélopathiques .....	30
3.2.2. Les effets insecticides et dissuasifs .....	30
3.3. Utilisation des stilbènes dans les cosmétiques .....	31
<b>4. Les Cypéracées</b> .....	31
4.1. Description générale .....	31
4.1.1. Appareil végétatif.....	32
4.1.2. Appareil reproducteur .....	33
4.1.3. Les principaux genres .....	33
4.2. Les Stilbènes des Cypéracées .....	33
 <b>Matériels et méthodes</b> .....	 38
<b>1. Matériel végétal</b> .....	38
<b>2. Techniques</b> .....	44
2.1. Etudes analytiques.....	44
2.1.1. Extraction .....	44
2.1.2. Agitation.....	44
2.1.3. Centrifugation .....	44
2.1.4. Séparation et récupération des phases liquides .....	45
2.1.5. Colonnes SPE.....	45
2.2. Etude préparative .....	48
2.2.1. Parties souterraines (rhizomes) .....	48
2.2.2. Parties aériennes (tiges, feuilles, akènes).....	48
2.3. Chromatographie sur Couche Mince : CCM .....	50
2.4. Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance : CLHP .....	51
2.4.1. CLHP analytique.....	51
2.4.2. CLHP semi-préparative.....	52
2.4.3. CLHP préparative .....	52
<b>3. Spectrométrie de masse (SM)</b> .....	53
3.1. Principe .....	53

3.2. Appareillage LC-Masse .....	53
3.3. Conditions d'analyse.....	54
3.4. Paramètres SIE, SM, SM <sup>n</sup> .....	54
<b>4. Résonance magnétique nucléaire (RMN) .....</b>	<b>55</b>
4.1. CL-RMN (Agilent 1200/Bruker 600Hz).....	57
<b>5. Chromatographie Partage Centrifuge : CPC.....</b>	<b>57</b>
5.1. Mise au point du système de solvants CPC .....	59
5.2. CPC 200 mL.....	59
5.3. CPC 1 L.....	60
<b>6. Tests biologiques .....</b>	<b>60</b>
6.1. Test d'activité antioxydante (DPPH) .....	60
6.1.1. Préparation des produits .....	60
6.1.2. Analyses .....	61
6.2. Tests d'activités antiradicalaires (ORAC) .....	61
6.3. Tests MCA (Metal Chelating Activity) .....	62
6.3.1. Objectif.....	62
6.3.2. Mode opératoire .....	62
6.4. Test PC12 .....	62
6.4.1. La culture des cellules PC12 .....	62
6.4.2. Les conditions expérimentales .....	63
6.4.3. Test de viabilité cellulaire .....	63
6.4.4. Dosage des espèces réactives de l'oxygène .....	64
 <b>Résultats et discussions .....</b>	 <b>66</b>
 <b>Partie 1. Etude des stilbénoides chez quelques Cypéracées .....</b>	 <b>69</b>
<b>1. Etude chromatographique, analytique et préparative .....</b>	<b>69</b>
1.1.CCM.....	69

1.2. CLHP analytique et CL-SM.....	69
1.3. CLHP préparative .....	73
1.3.1. <i>Carex hirta</i> .....	73
1.3.2. <i>Carex cuprina</i> .....	75
1.3.3. <i>Carex buehananii</i> .....	78
1.3.4. <i>Carex capillacea</i> .....	80
1.3.5. <i>Carex glauca</i> .....	81
1.3.6. <i>Carex virgata</i> .....	82
<b>2. Identification des structures par RMN .....</b>	<b>87</b>
<b>3. Dosages des stilbénoides identifiés chez les différents <i>Carex</i> .....</b>	<b>96</b>
<b>4. Discussion.....</b>	<b>97</b>
<b>5. Purification par Chromatographie de Partage Centrifuge.....</b>	<b>98</b>
5.1. <i>Cyperus eragostis</i> .....	99
5.2. <i>Carex arenaria</i> .....	103
 <b>Partie 2. Stilbénoides dans des vins tunisiens .....</b>	 <b>105</b>
1. Les vins étudiés .....	105
2. Prépurification sur résine XAD16 .....	105
3. Prépurification sur résine Dowex .....	105
4. Analyse par CLHP analytique et UPLC-Masse .....	106
5. Dosage des stilbènes présents dans les différents vin analysés.....	107
 <b>Partie 3. Evaluation des propriétés biologiques <i>in vitro</i> des stilbènes isolés</b>	 <b>109</b>
<b>1. Capacité antioxydante des stilbènes d'intérêt évaluée par 3 méthodes différentes : ORAC, DPPH et MCA .....</b>	<b>109</b>
1.1. Méthode ORAC .....	109
1.2. Méthode DPPH .....	110
1.3. Chélations des ions métalliques : test MCA (Metal Chelating Activity). .....	112

<b>2. Effets de stilbènes sur la viabilité neuronale en présence de <math>\beta</math>A .....</b>	<b>114</b>
<b>2.1. Détermination des seuils de toxicité des stilbènes sur les cellules PC12 .....</b>	<b>114</b>
<b>2.2. Effet des stilbènes sur la viabilité des cellules PC12 en présence de <math>\beta</math>A .....</b>	<b>115</b>
<b>3. Effets du carexinol A sur la production des ROS .....</b>	<b>119</b>
<b>Principales Conclusion de notre thèse.....</b>	<b>122</b>
<b>Perspectives principales.....</b>	<b>140</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>142</b>

**Kamel ARRAKI**

**Les stilbènoïdes chez les Cypéracées : Isolation, identification et étude de leurs activités biologiques.**

**Identification et dosage des stilbènes dans les vins tunisiens.**

Thèse d'Université : Sciences, Technologie et Santé

**Résumé :** Les stilbènes sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire végétal, leur distribution au sein du règne végétal est limitée aux espèces qui ont acquis au cours de l'évolution la capacité à synthétiser ces molécules. Leurs impacts et leurs activités biologiques tels que les effets neuroprotecteur, anticancérigène, antioxydant ont déjà concerné plusieurs sujets d'étude. C'est dans ce contexte que l'objectif de notre travail a pris naissance. Dans un premier temps, nous avons isolé et identifié ces molécules chez quelques espèces de la famille des Cypéracées. Cette étude phytochimique a été réalisée en utilisant un ensemble de stratégies analytiques et préparatives utilisant la CLHP analytique et préparative ainsi que la CPC (Chromatographie de Partage Centrifuge) pour l'obtention des molécules pures et l'utilisation de la LC-Masse et la RMN pour l'identification des composés isolés. Dans un second temps, nous avons étudié les activités biologiques *in vitro* de ces produits telles que les activités antioxydantes par trois méthodes (ORAC, DPPH et MCA) et l'effet de ces stilbènes sur la cytotoxicité neuronale induite par le peptide  $\beta$ -amyloïde avec des cellules PC12. Nous avons isolé une nouvelle molécule le carexinol A pour la première fois, cette molécule a montré une forte activité anti-amyloïde. Une dernière partie de cette thèse fait état de l'analyse et du dosage des stilbènes dans des vins tunisiens dont le vin Sidi Zahia qui a donné les meilleurs résultats.

En final, nos travaux montrent bien que les Cypéracées sont une famille très intéressante pour l'obtention de stilbènes complexes. Nous avons pu ainsi réaliser sur les stilbènes obtenus en grandes quantités des tests biologiques pour évaluer leurs potentialités pharmacologiques.

**Mots clés :** stilbènes, Cypéracées, CLHP, CPC, LC-Masse, RMN, ORAC, DPPH, carexinol  $\beta$ -amyloïde, vin tunisien.

Université de Bordeaux

Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte

GESVAB : Groupe d'Etude des Substances Végétales à Activités Biologiques

EA 3675 - UFR de Pharmacie - Université Bordeaux

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin - CS 50008- 33882 Villenave d'Ornon